Über die Isolierung und Strukturaufklärung der Rhamnoconvolvulinsäure aus Ipomoea operculata

1971

Peter Kazmaier

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0010

Über die Isolierung und Strukturaufklärung der Rhamnoconvolvulinsäure aus Ipomoea operculata

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Peter Kazmaier

aus

München

Mai 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1971

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
A. Bisherige Arbeiten	2
B. Untersuchung des Harzes von Ipomoea operculata	8
I. Identitätsprüfung	8
II. Darstellung von Convolvulin	8
III. Alkalische Hydrolyse	9
IV. Charakterisierung von Acetat I	12
V. Gewinnung der Glykosidsäure	12
C. Strukturaufklärung der Rhamnoconvolvulinsäure	16
I. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse	16
II. Qualitative und quantitative Fettsäureanalyse	20
III. Aufklärung der Struktur der Hydroxyfettsäure	22
IV. Aufklärung der Verknüpfungsweise von Zucker und Hydroxyfettsäure	36
V. Untersuchungen zur Struktur des Zuckeranteils	38
VI. Acetolyse der Rhamnoconvolvulinsäure und Ermittlung der Zuckersequenz	51
D. Diskussion	61
EXPERIMENTELLER TEIL	63
A. Herkunft der Droge	63
B. Allgemeine Arbeitsmethoden	63
I. Papierchromatographie	63
II. Dünnschichtchromatographie	64
III. Präparative Dünnschichtchromatographie	65
IV. Säulenchromatographie	66
V. Gaschromatographie	67
C. Physikalische Untersuchungen	68
D. Identitätsprüfung des brasilianischen Jalapenharzes durch Nachweis der Exogonsäure	69
I. Auf Grund der Fähigkeit zur Oximbildung	69
II. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Exogonsäure	69

Seite

E. Gewinnung der Rhamnoconvolvulinsäure 70
I. Isolierung von Convolvulin 70
II. Alkalische Hydrolyse mit Natriummethylatlösung . 70
III. Acetylierung 71
IV. Isolierung des Rhamnoconvolvulinsäureacetats . . 71
V. Entacetylierung von Acetat I 72
F. Chemische Untersuchungen der Rhamnoconvolvulinsäure 73
I. Hydrolysen 73
II. Darstellung der Zuckerosazone 73
III. Darstellung der Fettsäuremethylester 74
IV. Quantitative Bestimmung der Zucker 75
V. Quantitative Bestimmung der Fettsäure 81
G. I. Permethylierung 82
II. Hydrolyse 83
III. Darstellung der Methylzuckeralditolacetate . . . 84
H. Acetolyse 85
I. Darstellung der Oligosaccharidacetate 85
II. Trennung der Oligosaccharidacetate 85
III. Darstellung der freien Oligosaccharide 86
IV. Anreicherung der Disaccharide 86
I. Chromatoxidation des Glykosidsäuremethylesters . . . 87

Tabelle der bisher aus Convolvulaceen isolierten Glykoresine und deren Bausteine 89

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 94

EINLEITUNG

Laxierend wirkende Glykosidharze können nach HEGENAUER als die auffallendsten chemischen Merkmale der Convolvulaceen - Familie angesehen werden. Während die einzelnen Bausteine dieser Harze, Hydroxyfettsäuren, Fettsäuren und Zucker, weitgehend bekannt sind, ist die genaue Struktur dieser Harze bzw. der ihnen zugrunde liegenden Glykosidsäuren weitgehend ungeklärt.

Erst in den letzten Jahren konnten MISRA und TEWARI[22] die Struktur von Muricatin B von Ipomoea muricata und OKABE u. KAWASAKI[17] die Struktur der Pharbitinsäuren C und D von Pharbitis Nil CHOISY ermitteln.

Da die Strukturaufklärung möglicherweise auch Einblick in die für die pharmakologische Wirksamkeit verantwortlichen Strukturanteile bringt und Anreiz zu Synthesen schaffen könnte, war es das Ziel unserer Arbeit, die Struktur der Rhamnoconvolvulinsäure von Ipomoea operculata MARTIN aufzuklären und zugleich allgemein gültige Analysenmethoden zur Darstellung und Analyse von Glykosidsäuren auszuarbeiten.

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Bisherige Arbeiten

Die unterirdischen Pflanzenteile zahlreicher Vertreter der Convolvulaceen-Familie (Windengewächse) enthalten glykosidische Harze, die seit langer Zeit als Abführmittel angewandt wurden. Die Pflanzen werden in Mexico, Jamaica und Brasilien angebaut und kommen in Indien verbreitet vor. In den deutschen Arzneischatz haben die Knollen (Tubera) bzw. die daraus gewonnenen Harze von Ipomoea purga WENDEROTH, BENTHAM als o f f i z i n e l l e s J a l a p e n h a r z , von Ipomoea operculata MARTIN als b r a s i l i a n i s c h e s J a l a p e n h a r z , von Ipomoea orizabensis LEDANOIS als S k a m m o n i u m h a r z und von Ipomoea Turpethum BROWN als T u r p e t h i - H a r z Eingang gefunden. Während das Jalapen-Harz noch im DAB 6 wie auch in zahlreichen anderen älteren Arzneibüchern als offizinelle Droge geführt wurde, ist es unter den heute gültigen Pharmakopoeen nur noch in der CsL 2, Dan. IX, Belg. V, Hisp. IX, Jap. 62, dem ÖAB 9 und der CF 65 vertreten. Die ältere Literatur über Jalapenharz ist sehr umfangreich. Hinzu kommt, daß eine oft ziemlich willkürliche Namensgebung zusätzliche Verwirrung gestiftet hatte. So wurde gereinigtes Skammonium-Harz Jalapin, Jalapenharz jedoch Convolvulin gelegentlich aber auch Jalapin genannt. Eine gute Übersicht über die ältere Literatur findet sich in dem Werk "Die Harze" von TSCHIRCH u. STOCK[1]. Wir wollen hier nur einige der wichtigsten Arbeiten erwähnen.

1817 führte CADET de GASSICOURT[2] erste Untersuchungen über die geeignetsten Extraktionsbedingungen durch. 1844 untersuchte KAYSER[3] die hydrolytischen Spaltprodukte. Einen ersten Einblick in den chemischen Bau der Harze gewann man um die Jahrhundertwende durch den hydrolytischen Abbau der Harze mit Barytlauge und Säuren.

So erhielten KROMER[4], TAVERNE[5] und HOEHNEL[6] etwa zur gleichen Zeit beim alkalischen Abbau neben flüchtigen Säuren wasserlösliche Glykosidsäuren, die bei der nachfolgenden sauren Hydrolyse Hydroxyfettsäuren und Zucker lieferten. 1929 gelang es VOTOCEK u. VALENTIN[7] aus "Resina Jalapae e radice ponderosa alba" Merck nach Barythydrolyse eine kristalline Glykosidsäure, die Rhamnoconvolvulinsäure $C_{52}H_{92}O_{32}$ darzustellen. Diese lieferte bei saurer Hydrolyse 4 Mol Glucose, 2 Mol Rhamnose und 1 Mol einer Hydroxysäure, die VOTOCEK u. PRELOG[8] als 3,12-Di-OH-palmitinsäure identifizierten. Sie nahmen an, daß in dieser Rhamnoconvolvulinsäure je drei Monosen, 2 Mol Glucose und 1 Mol Rhamnose symmetrisch an beide Hydroxylgruppen der 3,12-Di-Hydroxy-palmitinsäure gebunden sind. MANNICH u. SCHUMANN[9] konnten in der gleichen Handelsdroge nach alkalischer Hydrolyse Rhamnoconvolvulinsäure und als flüchtige Säuren Methyläthylessigsäure, Isovaleriansäure, Tiglinsäure und Exogonsäure nachweisen. Die Autoren untersuchten auch die abführende Wirkung. Sie fanden, daß das Harz nur in Form des intakten Makromoleküls wirksam ist. Für das Makromolekül gaben sie folgendes allgemeines Aufbauprinzip an: Drei oder vier Zuckerhydroxygruppen der Glykosidsäure sind mit den durch alkalische Hydrolyse abspaltbaren Fettsäuren esterartig verknüpft und eine Reihe derartiger Bausteine ist durch fortgesetzte Esterbindung zu Makromolekülen zusammengefügt, wie dies in nachfolgendem Schema gezeigt wird:

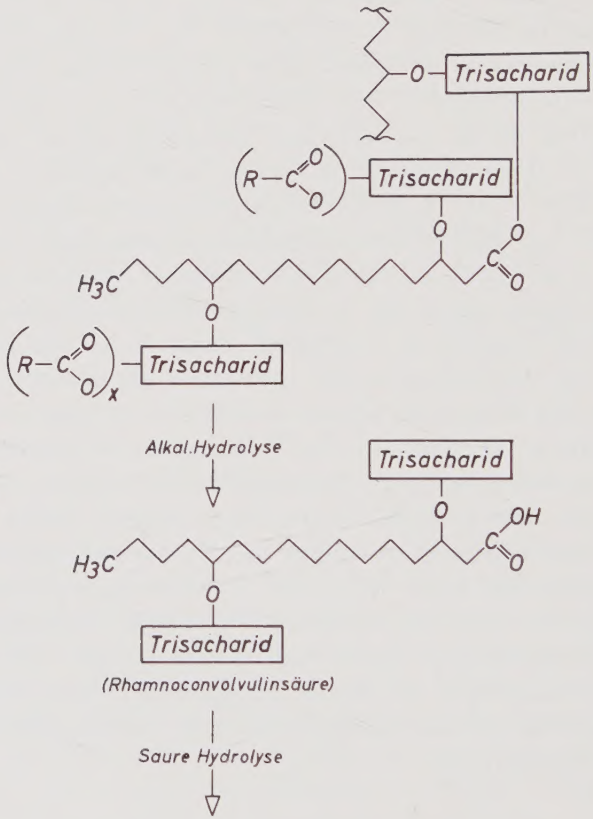


Abb. 1

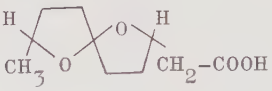
Aufbauschema der Glykoresine nach MANNICH u. SCHUMANN[9)]

BAUER u. JUNGE[10] hatten schon einige Jahre zuvor Skammoniumharz von Convolvulus scammonia L. bearbeitet und bei der alkalischen Hydrolyse Skammoninsäure gefunden. Diese ergab bei saurer Hydrolyse Skammonolsäure, eine, wie ASAHINA u. YAOI[11] zeigen und durch Synthese beweisen konnten, 11-Hydroxy-hexadecansäure und die bereits durch VOTOCEK gefundenen Zucker Glucose, Rhamnose und Rhodeose. JARETZKY u. RISSE[12] untersuchten verschiedene Convolvulaceenharze. Ihre Wirksamkeit brachten sie in Verbindung mit Löslichkeit und Säurezahl. Bei alkalischer Hydrolyse fanden sie in allen Harzen Glykosidsäuren mit ähnlichen Schmelzpunkten. Daraus schlossen sie, daß diese Glykosidsäuren sehr ähnlich wenn nicht sogar miteinander identisch seien. Nach Hydrolyse der Glykosidsäuren konnten sie jeweils Glucose und Rhamnose nachweisen.
AUTERHOFF u. DEMLEITNER[13] bearbeiteten 1955 die im DAB 6 und Ergänzungsbuch Verwendung findenden Convolvulaceenharze. Mit Hilfe der eben erst bekannt gewordenen Papierchromatographie versuchten sie die verschiedenen Convolvulaceenharze näher zu charakterisieren.

1961 verglich SHELLARD[14] einige Convolvulaceenharze. Die nach alkalischer Hydrolyse frei werdenden Säuren wurden gaschromatographiert, während die verbleibenden Glykosidsäuren nach ihrer Löslichkeit in Äther getrennt und anschließend sauer hydrolysiert wurden. SHELLARD fand Hydroxysäuren und Zucker. Aus Ipomoea purga WENDEROTH konnte er Ipurolsäure und eine Oxypentadecansäure isolieren. Er fand, daß es sich nicht um die von VOTOCEK u. PRELOG[8] angegebene 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure handelte.

GRAF, DAHLKE u. VOIGTLÄNDER[15] schließlich suchten eindeutige Unterscheidungsreaktionen für brasilianisches Jalapenharz (Resina operculina) und das im DAB 6 aufgenommene mexikanische Jalapenharz. Sie hydrolysierten Harze, deren Herkunft durch pharmakognostische Untersuchungen an Wurzelknollen sichergestellt war. In der DAB 6-Droge fanden sie an Zuckern Glucose, Rhamnose und Fucose, im brasilianischen Harz dagegen nur Glu-

cose und Rhamnose. Als typische Bausteine des brasilianischen Harzes konnten sie die 4-Oxo-caprylsäure und die Exogonsäure isolieren. Für die Exogonsäure ermittelten sie die Struktur 3,6,6,8-Dioxidodecansäure, die ein Gemisch aus 4 Stereomeren darstellt.



3,6,6,8-Dioxidodecansäure

Sie zeigten auch, daß VOTOCEK u. VALENTIN[7] bzw. VOTOCEK u. PRELOG[8] bei ihren Untersuchungen nicht offizinelles, sondern brasilianisches Jalapenharz bearbeitet hatten, so daß Rhamnoconvolvulinsäure als der wesentliche Bestandteil des brasilianischen Harzes anzusehen ist.

Alle bisherigen Arbeiten geben nur eine Bausteinanalyse der Glykosidharze. Die Verknüpfung ihrer Bausteine untereinander, speziell der Zucker, ist bis auf einige Glykosidsäuren ungeklärt.

Mit Hilfe verfeinerter Untersuchungsmethoden, wie IR-, KMR- und Massenspektrometrie konnten z.B. KHANNA u. GUPTA[16] zeigen, daß Muricatin B (von Ipomoea muricata) ein (+)-11-Hydroxy-hexadecansäure-4O-L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosid ist. OKABE u. KAWASAKI[17] fanden, daß die bereits von ASAHINA u. TERADA[18] aus den Samen von Pharbitis Nil CHOISY isolierte Pharbitinsäure ein Gemisch aus 4 Komponenten darstellt.
Von diesen untersuchten sie Pharbitinsäure C und D.
Sie fanden, daß das Aglucon (die Ipurolsäure) eine 3,11-Dihydroxy-tetradecansäure ist. Weiter konnten sie beweisen, daß bei der Pharbitinsäure C die OH-Gruppe am C_{11} mit einem Pentasaccharid, für das sie drei verschiedene Strukturvorschläge

machten, glykosidisch verknüpft ist. Bei der Pharbitinsäure D ist die gleiche OH-Gruppe mit einem Hexasaccharid, bei dem an der endständigen Quinovose des Pentasaccharides eine Rhamnose sitzt, verknüpft. Eine ähnliche Glykosidsäure konnten TULLOCH, HILL u. SPENCER[19] aus Torulopsis apicola Cryptoccaceae isolieren. Sie fanden ein 17-Hydroxy-octadecansäure-sophorosid, dessen beide Glucosen in 6, bzw. 6' acetyliert sind und das sowohl als freie Säure als auch als Lacton vorliegt.

Schließlich gewannen TULLOCH, SPENCER u. DEINEMANN[20] aus Candida bogoriensis Stämmen ein extra-zellulär vorkommendes Glykosid ähnlicher Struktur in 0.5 bis 1promilliger Ausbeute. Als Hauptbestandteil isolierten sie ein kristallines 13-Hydroxy-docosansäure-sophorosid-6,6'-diacetat.

Gegenstand der nachfolgenden Arbeiten ist die vollständige Strukturaufklärung der Rhamnoconvolvulinsäure.

B. Untersuchung des Harzes von Ipomoea operculata

I. Identitätsprüfung

Zur Untersuchung gelangte Resina Jalapae DAB 6 (Lieferant Fa. Duvernoy Nachf., Stuttgart). Da wir nach alkalischer und anschließender saurer Verseifung nur Glucose und Rhamnose fanden, war anzunehmen, daß es sich um brasilianisches Jalapenharz handelte. Dies konnten wir durch den Nachweis der Exogonsäure bestätigen. Hierzu wurde nach der von GRAF, DAHLKE u. VOIGTLÄNDER[15] beschriebenen Methode eine methanolische Harzlösung mit Hydroxylaminhydrochloridlösung und Bromphenolblau versetzt und neutralisiert. Da die Exogonsäure ein Oxim bildet, schlägt die Farbe einer Exogonsäurehaltigen Lösung infolge frei gewordener Salzsäure von Rot nach Gelb um. Eine weitere Bestätigung war der dünnschichtchromatographische Nachweis von Exogonsäure nach GRAF, DAHLKE u. VOIGTLÄNDER.

Somit war sichergestellt, daß es sich um brasilianisches Jalapenharz von Ipomoea operculata MARTIN Convolvulaceae handelte.

II. Darstellung von Convolvulin (siehe auch Isolierungsschema S. 15)

PEYER u. ROSENTHAL[21] reinigten Resina Jalapae von Tubera Jalapae pulv., indem sie das Harz zuerst mit Wasser mazerierten und dann aus äthanolischer Lösung mehrfach mit Äther ausfällten. Sie erhielten ein Convolvulin vom Schmelzpunkt 152°. Allerdings konnten die Autoren nicht mit Sicherheit angeben, ob es sich bei dem Drogenmaterial um brasilianische oder offizinelle Jalapenwurzelknollen gehandelt hat. Wir lösten das Harz zur Reinigung bzw. Darstellung von reinem Convolvulin in Methanol und entfernten nach MISRA u. TEWARI[22] die Gerbstoffe durch Bleiacetatbehandlung.

Aus der so gereinigten Lösung wurde durch Fällen mit Äther eine braune klebrige Masse erhalten. Der braune Niederschlag wurde in Methanol gelöst, erneut mit Äther gefällt und dies so oft wiederholt, bis wir eine gelblich weiße pulvrige Substanz erhielten.

Das Convolvulin (Schmelzber.: 140 - 142°C) war löslich in Wasser und Methanol, schwerer löslich in Äthanol und unlöslich in Äther und Chloroform. Beim Glühen verblieb kein wägbarer Rückstand. Freie Zucker waren nicht nachweisbar. Das IR-Spektrum zeigte die typische Hydroxylbande bei 3200 - 3500 cm^{-1}, eine Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} und mehrere Banden im Bereich von 900 - 1250 cm^{-1}, die auf Zuckerverbindungen schließen lassen. Im UV-Spektrum trat ein Maximum bei 216 mμ auf, das LEGLER[23], der das Glykosidharz aus Ipomoea fistulosa MART et CHOIS untersuchte, der esterartig gebundenen Tiglinsäure zuordnete. Auch wir konnten in unserem Harz Tiglinsäure nachweisen.

Chromatographisch konnten wir in keinem der von uns erprobten Systeme einen einheitlichen Fleck erhalten. Die Substanz zog sich stets über die ganze Lauffläche hin. Während die meisten Autoren das Harz direkt der alkalischen Hydrolyse unterwarfen, gingen wir zur Darstellung der Glykosidsäuren von gereinigtem Convolvulin aus.

III. Alkalische Hydrolyse

Zur Abspaltung der esterartig gebundenen Fettsäuren wurden bisher Natronlauge oder Barytwasser verwandt. Da häufig beim Erhitzen bzw. langen Stehen Alkali katalysierte Zersetzung der Zucker auftritt, verwendeten wir für die katalytische Esterspaltung Natriummethylatlösung und arbeiteten in der Kälte. Hierbei werden die Glykosidsäuren gleichzeitig quantitativ in ihre Methylester übergeführt. Die Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert und die Glykosidsäuremethylester mit Äther ausgefällt.

Die weitere Reinigung der Ätherfällung, es sollte sich nach GRAF, DAHLKE u. VOIGTLÄNDER[15] um Rhamnoconvolvulinsäuremethylester handeln, versuchten wir über das Acetat. Dünnschichtchromatographisch fanden wir nach der Acetylierung zwei Flecken, die wir als Acetat I (R_f = 0.95) und Acetat II (R_f = 0.6) bezeichneten.

Wir isolierten das Acetat I über eine Kieselgelsäule und reinigten es über Kohle/Celite.

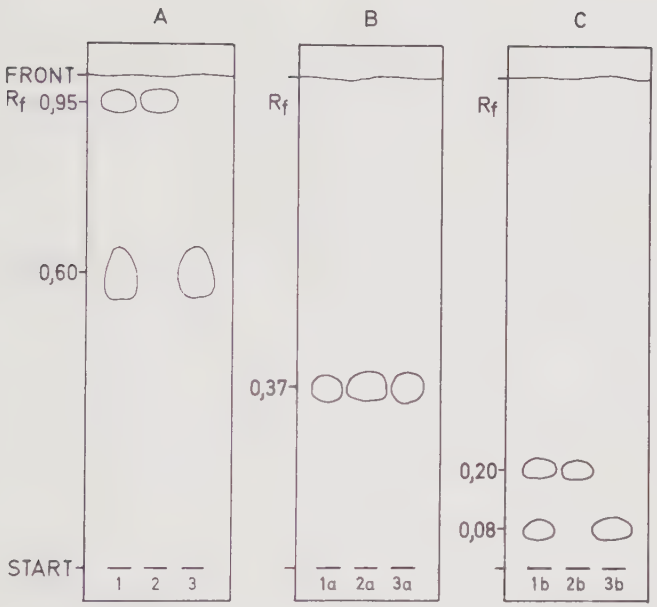


Abb. 2

Dünnschichtchromatographie des Convolvulinsäureacetates, der isolierten Acetate und der daraus dargestellten Glykosidsäure-methylester

A

1 = Convolvulinsäureacetat

2 = Acetat I

3 = Acetat II

Kieselgel H/Benzol-Aceton (1:1)

B

1a = Convolvulinsäure

2a = Acetat I entacetyliert

3a = Acetat II entacetyliert

Kieselgel H/iso-Propanol-NH_3 10% (2:1)

C

1b = Convolvulinsäure

2b = Acetat I entacetyliert

3b = Acetat II entacetyliert

Kieselgel H/Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)

IV. Charakterisierung von Acetat I

Das Acetat war ein gelblich weißes, amorphes Pulver, löslich in organischen Lösungsmitteln, unlöslich in Wasser. Es besaß keinen definierten Schmelzpunkt, sondern zerfloß zwischen 94^{o} und 96^{o}C. Das IR-Spektrum (siehe Abb. 3) zeigte, wie schon das gereinigte Harz, die Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} und im Bereich von 900 - 1250 cm^{-1} mehrere Banden, die den von KUHN[24] für Zuckeracetate beschriebenen nach Lage und Zahl sehr ähnlich waren. Da die OH-Bande bei 3400 cm^{-1} verschwunden war, mußte die Glykosidsäure voll acetyliert sein. Das gefundene Molekulargewicht betrug nach einer Bestimmung im Dampfdruckosmometer in Benzol 2040. Theoretisch errechnet sich für das Octadecaacetat des Rhamnoconvolvulinsäuremethylesters ein Molgewicht von 2010.

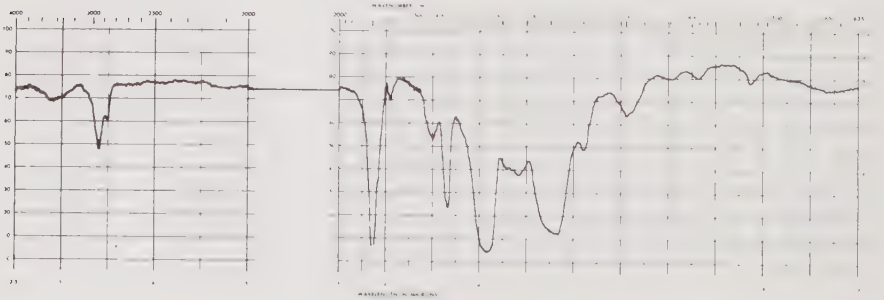


Abb. 3

IR-Spektrum des Acetats I

V. Gewinnung der Glykosidsäure

Um die freie Glykosidsäure zu erhalten, verseiften wir das Acetat mit methanolischer N-Natronlauge und fällten nach dem Ansäuern mit Äther aus. Um den Niederschlag von anorganischen Verunreinigungen zu befreien, bedienten wir uns der von FLODIN[25] beschriebenen Gelfiltration. Wir benutz-

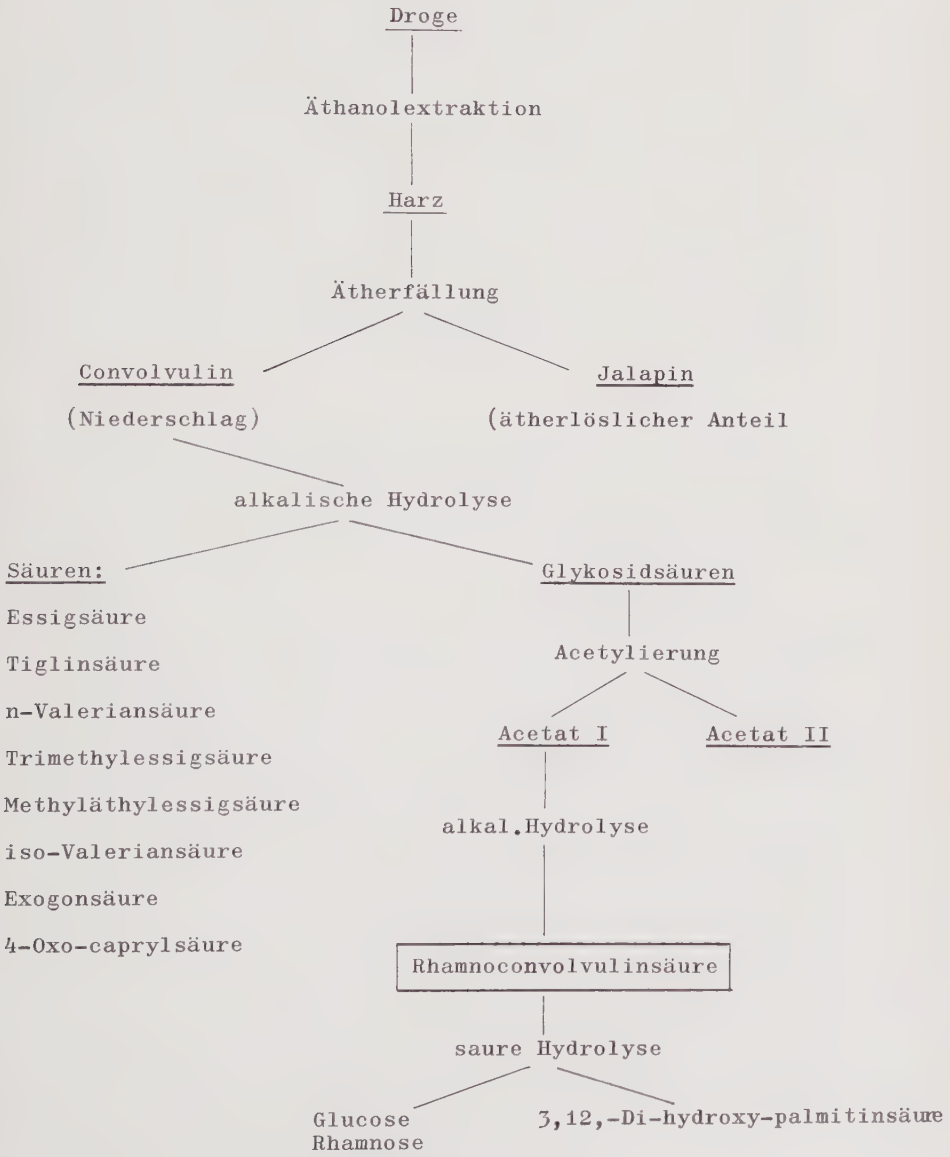
ten Sephadex G_{15}, bestimmten das Außenvolumen mit Dextranblau (Pharmacia Uppsala) und setzten der Probe Natriumchlorid zu. Da das Gel nach Molekulargewicht trennt, mußte die Substanz zwischen den durch das Außenvolumen bestimmten Fraktionen und der ersten Chlorid positiven Fraktion liegen. Wir engten die wässrige Lösung zur Trockene ein und kristallisierten aus Äthanol um. Die Kristalle verloren beim Trocknen unter Kristallwasserabgabe ihre Form. Die getrocknete Substanz schmolz unter Blasenbildung bei 182 - 185°C. Das titrimetrisch ermittelte Molekulargewicht (berechnet auf eine einbasige Säure) betrug: 1265 (theoretisch für Rhamnoconvolvulinsäure: 1232). Das IR-Spektrum zeigte die typische Hydroxylbande bei 3200 - 3500 cm^{-1}, eine Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} und mehrere Banden im Bereich von 900 - 1250 cm^{-1}, die nach Lage und Zahl mit den von KUHN[24] für Oligosaccharide beschriebenen in etwa übereinstimmten. Ebenso wie die Elementaranalyse und das Molekulargewicht stimmen alle von uns gefundenen Daten mit den von VOTOCEK u. VALENTIN[7] für die Rhamnoconvolvulinsäure gefundenen überein.

Zur Darstellung des Glykosidsäuremethylesters entacetylierten wir katalytisch mit Natriummethylatlösung. Da der Ester nicht kristallisierbar war, wurde er in gleicher Weise wie die freie Säure gereinigt und gefriergetrocknet. Der lyophilisierte Methylester war ein weißes, amorphes, in Wasser, niederen Alkoholen und Pyridin lösliches, in den übrigen organischen Lösungsmitteln aber unlösliches Pulver vom Schmelzpunktbereich 142 - 145°C (unter Blasenbildung).

Das UV-Spektrum ergab, wie das der freien Säure keine charakteristischen Maxima. Das IR-Spektrum war mit dem der freien Säure fast identisch, lediglich die Carbonylbande war, wie zu erwarten, in den für Estercarbonyl charakteristischen Bereich von 1700 cm^{-1} verschoben.

Der in der Literatur bisher nicht beschriebene Rhamnoconvolvulinsäuremethylester wurde dünnschichtchromatographisch in dem von WAGNER, HÖRHAMMER u. WOLFF[26] für Lipide angegebenen Laufmittel untersucht. Nach dem Besprühen mit Rhodamin G in natronalkalischer Lösung fanden wir einen im UV gelb fluorescierenden Fleck (R_f: 0.13). Im Laufmittel iso-Propanol-Ammoniak 10% (2:1) fanden wir nach Behandlung mit dem gleichen Sprühmittel einen Fleck bei R_f: 0.42. Der von uns dargestellte Methylester verhielt sich dünnschichtchromatographisch einheitlich.

I S O L I E R U N G S G A N G



C. Strukturaufklärung der Rhamnoconvolvulinsäure

I. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Zur qualitativen Analyse des Zuckeranteils hydrolisierten wir die Rhamnoconvolvulinsäure mit wässriger Mineralsäure. Zur Hydrolyse ihres Acetates verwendeten wir wegen der Wasserunlöslichkeit 50%ige methanolische Säuren. Nach der Hydrolyse entfernten wir das Methanol und hydrolysierten weiter in wässrigem Medium, um die gebildeten Methylglykoside zu zerstören. Wir fanden in beiden Fällen papierchromatographisch G l u c o s e und R h a m n o s e . Damit war das Ergebnis von VOTOCEK u. VALENTIN[7], die Glucose durch Vergärung und Rhamnose als Phenylhydrazon nachgewiesen hatten, bestätigt.

Zusätzlich stellten wir aus dem Zuckergemisch in der üblichen Weise die Osazone dar und trennten sie auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in Aceton. Das Glucoseosazon schmolz bei 205° - 207°C, das Rhamnoseosazon bei 178° - 180°C.

BAUER u. JUNGE[10] bestimmten nach schwefelsaurer Hydrolyse des Skammonins die gesamten Aldosen jodometrisch. Die Glucose wurde durch Vergärung im Lohnstein'schen Saccharometer bestimmt. Den Anteil der übrigen Aldosen ermittelten sie nach Vergärung der Glucose durch erneute jodometrische Titration. VOTOCEK u. VALENTIN[7] fanden nach der gleichen Methode für die Rhamnoconvolvulinsäure ein molares Glucose-Rhamnose-Verhältnis 2:1. Auch die optische Drehung des Hydrolyseproduktes stimmte mit der einer Testlösung aus 2 Teilen Glucose und 1 Teil Rhamnose überein.

Zum q u a n t i t a t i v e n Zuckernachweis im Mikromaßstab boten sich eine Reihe von Methoden an.

FISCHER u. DÖRFEL[27] bestimmten die Zucker quantitativ durch Photometrierung des Formazans. Hierzu werden die Zucker papierchromatographisch entwickelt, auf dem Papier zum Formazan umgesetzt, eluiert und photometrisch bestimmt. Diese Methode bereitet jedoch erhebliche Schwierigkeiten, da Papier relativ hohe Leerwerte liefert, die Reaktion nur unter ganz bestimmten Bedingungen stöchiometrisch verläuft und das Lambert-Beer'sche Gesetz nur in bestimmten Konzentrationsbereichen erfüllt ist.

GUINN[28] arbeitete den in der klinischen Chemie für die Blutzuckerbestimmung üblichen Ferricyanidtest für andere reduzierende Zucker aus. Dieser Test erlaubt zwar auf Grund seiner überaus hohen Empfindlichkeit Bestimmungen im Submikromaßstab, aber auch hier müssen die Zucker zuvor auf dem Papier getrennt werden.

Die von MALLOV[29] beschriebene Anthron-Methode ist nach DISCHE[30] zur quantitativen Bestimmung von Glucose und Rhamnose nebeneinander nicht geeignet, da verschiedene Zucker im gewählten Meßbereich eine unterschiedliche molare Absorption besitzen.

Die Methode ermöglicht aber die Ermittlung der optimalen Hydrolysendauer. Das Polysaccharid ist quantitativ hydrolysiert, wenn die Zuckermenge, in unserem Fall auf Glucose bezogen, konstant bleibt. Wir hydrolysierten das Acetat in Ampullen mit 3N Schwefelsäure und fanden, daß nach 5 Stdn. vollständige Hydrolyse eingetreten war.

T a b e l l e 1

Zuckerbestimmung nach der Anthron-Methode bezogen auf Glucose in Abhängigkeit zur Zeit

Hydrolysedauer Stdn.	Einwaage mg	Extinktion	Zucker mg	Zucker %
3	1.70	2.40	0.64	37.80
5	0.96	1.42	0.38	39.58
8	1.16	1.67	0.45	39.70

Hierbei stört die Bildung von Methylglykosiden nicht, da die glykosidische Bindung durch den hohen Schwefelsäuregehalt der Reaktionslösung in der Hitze sofort gespalten wird.

Zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Zucker nebeneinander wählten wir die von DISCHE[30] entwickelte Cysteinmethode. Bereits BANDOW[31] hatte gefunden, daß die durch Schwefelsäure aus den verschiedenen Zuckern gebildeten Furfurale bzw. deren Homologe im UV-Bereich charakteristische Spektren lieferten. Da aber die Absorptionsmaxima zu nahe beieinander liegen, konnten diese Spektren nicht zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden, wie HOLZMANN[32] u. Mitarb. gezeigt haben.

DISCHE[33] fand, daß Furfural und seine Homologen in 84%iger Schwefelsäure mit SH-Gruppen Reaktionsprodukte bilden, deren Absorptionsspektren sich stark voneinander unterscheiden. (Für Hexosen liegt das entsprechende Maximum bei 412 -414 mμ, für Methylpentosen bei 400 mμ). Hinzu kommt, daß die Geschwindigkeit, mit der diese Derivate gebildet werden, von Zuckertyp zu Zuckertyp verschieden ist. Während die Farbreaktion der Hexose sehr schnell ihr Maximum erreicht, ist die Farbbildung bei der Methylpentose verzögert. Das Prinzip der dichromatischen Ablesung beruht darauf, daß bei zwei verschiedenen Wellenlängen abgelesen und die Differenz graphisch dargestellt

wird. Anhand einer Eichgeraden können dann die entsprechenden Zuckeranteile ermittelt werden. Man wählt die Wellenlängen so, daß ihre Differenz für den einen zu bestimmenden Zucker möglichst groß, für den anderen aber annähernd gleich Null ist.

Zur quantitativen Glucosebestimmung wählt man die Differenz $E_{414}-E_{380}$, die im Bereich von 10 - 200 γ/ml proportional der Hexosenkonzentration ist. Da E_{414} und E_{380} für Methylpentosen nahezu gleich ist, wird eine Störung durch diese Zucker ausgeschlossen. Um Fehlmessungen auszuschließen, setzten wir der Testlösung zur Aufstellung der Eichgeraden Rhamnose in der prozentualen Menge, die wir auch in der Probelösung erwarteten zu. (siehe Tab. 9 und 10, S. 80). Der Extinktionskoeffizient der Methylpentosen ist sehr hoch, weshalb die Differenz $E_{396}-E_{427}$ nur für Konzentrationen im Bereich von 2 γ bis 20 γ proportional ist. Für Hexosen ist die Differenz dieser beiden Wellenlängen wiederum gleich Null. Um Störungen sicher auszuschließen, wird die Erhitzungszeit von 3 auf 10 Min ausgedehnt. Dies hat zur Folge, daß die Hexosenchromogene zum größten Teil zerstört werden, während bei den Methylpentosen keine Änderung der Absorptionskurven auftritt.

Mit Hilfe dieser Methode ermittelten wir folgende Zuckerwerte: G l u c o s e 63.4% , R h a m n o s e 29.9% .

Der berechnete Zuckergehalt für Rhamnoconvolvulinsäuremethylester beträgt unter Annahme der Formel von VOTOCEK u. VALENTIN[7] für Glucose: 63.77% und Rhamnose: 29.34%.

II. Qualitative und quantitative Fettsäureanalyse

Zur G e w i n n u n g der Hydroxysäure, die das Aglucon der Rhamnoconvolvulinsäure darstellt, wurde mit 4 N methanolischer Schwefelsäure hydrolysiert. Der gebildete Methylester wurde mit Chloroform ausgeschüttelt.

Der dünnschichtchromatographische Nachweis erfolgte auf selbst gestrichenen Kieselgel H Merck-Platten im Laufmittel Äther-Petroläther (7:3) nach ROOMI, SUBBARAM u. ACHAYA[34]. Als Indikator wählten wir Pyranin*) (= 3-Hydroxy-pyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium), das in Wasser gut, in Aceton schlecht und in den restlichen organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich ist. Die Fettsäuren und deren Methylester erscheinen mit diesem Indikator bei Betrachtung im UV-Licht als hellblau fluorescierende Flecken auf grünblauem Untergrund.

Der Methylester erschien bei einem R_f von 0.37, während der 12-Hydroxy-stearinsäuremethylester und der α-Hydroxy-laurinsäuremethylester einen R_f von 0.68 hatten (siehe Abb. 4, S.21). Die freie Säure, die wir durch alkalische Verseifung des Methylesters darstellten, wurde in dem von REHM[35] angegebenen Laufmittel Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure(90:10:2)chromatographiert. Sie hatte einen R_f von 0.14 (α-Hydroxy-laurinsäure R_f: 0.37). Der niedere R_f-Wert von Säure und Ester ließ auf eine Dihydroxyfettsäure schließen.

Den reinen Säuremethylester stellten wir durch präparative Dünnschichtchromatographie im beschriebenen System dar. Die eluierte Substanz kristallisierte bei tiefer Temperatur (-20°C) aus Äther-Petroläther in feinen Plättchen aus. Nach dreimaligem Umkristallisieren betrug der Schmelzpunkt 80°- 81°C.

Zur q u a n t i t a t i v e n Bestimmung der Fettsäure wurde eine genau gewogene Menge Glykosidacetat in einer Ampulle mit der 100-fachen Menge 50% methanolischer 3N Schwefelsäure hydrolysiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Der getrocknete Chloroformrückstand ergab 15.3% Fettsäuremethylester (theor.: 15.04%).

*) Wir danken der Fa. BAYER für die Überlassung des Pyranins.

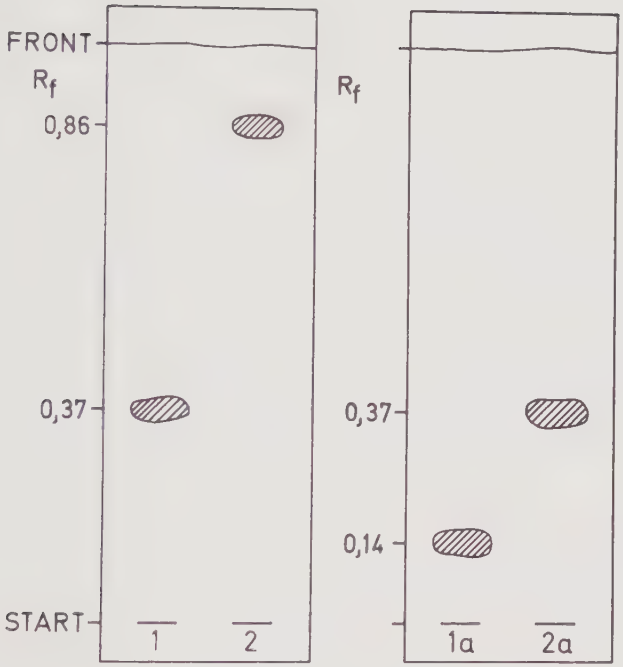


Abb. 4

Dünnschichtchromatographie der Hydroxy-Fettsäuremethylester und der freien Hydroxy-Fettsäuren

1 = 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylester
2 = α-Hydroxy-laurinsäuremethylester
Kieselgel H/Pyranin
Petroläther-Äther 3:7

1a = 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure
2a = α-Hydroxy-cerotinsäure
Kieselgel H/Pyranin
Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure 90:10:2

III. Aufklärung der Struktur der Hydroxyfettsäure

VOTOCEK u. PRELOG[8] haben die von ihnen aus der Rhamnoconvolvulinsäure isolierte Fettsäure durch Chromoxidation (siehe Schema in Abb. 5) als eine 3,12-Di-hydroxypalmitinsäure identifiziert. Obwohl auf Grund der übereinstimmenden Schmelzpunkte eine Identität unserer Fettsäure mit der von VOTOCEK u. Prelog wahrscheinlich war, mußte auf Grund der zahlreichen unterschiedlichen Angaben in der Literatur der eindeutige Strukturbeweis erbracht werden. Zur Beweisführung bedienten wir uns in erster Linie spektroskopischer Methoden.

Chromatabbau der 3,12-Di-Hydroxypalmitinsäure

(nach Votocek)

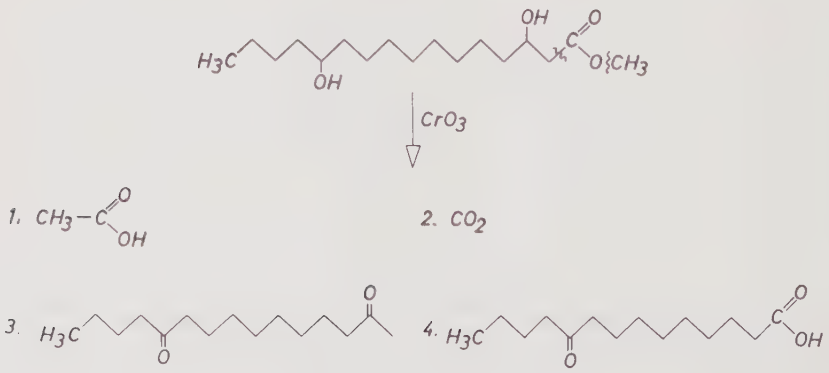


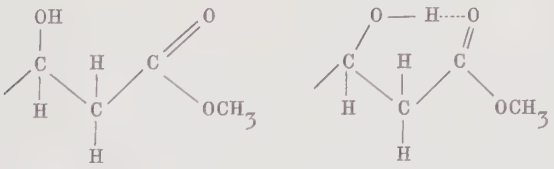
Abb. 5

1. KMR-Spektroskopie

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von HOPKINS u. BERNSTEIN[36] und REHM[35] in unserem Arbeitskreis fanden wir für unsere Fettsäure das Signal für die ω -CH_3-

Gruppe bei δ = 0.88 (integriert für 3 Protonen), das für die CH_2-Kette (integriert für 22 Protonen) bei δ = 1.35 und ein Signal bei δ = 3.68 für die Methylesterprotonen. Das für 2 Protonen intergrierte Signal bei δ = 2.14 verschwand bei D_2O-Austausch und war damit den Hydroxylprotonen zuzuordnen.

REHM hatte durch Vergleich von α-unsubstituierten und α-Hydroxyfettsäuren gezeigt, daß die α-CH_2-Protonen als Duplett bei δ = 2.2 erscheinen und bei α-Hydroxyfettsäuren fehlen. Da das KMR-Spektrum in diesem Bereich kein Signal aufwies, nahmen wir zunächst an, daß sich eine der beiden Hydroxylgruppen in α-Stellung befinden müsse. Diese erste Deutung konnten wir mit Hilfe der IR- und Massenspektrometrie widerlegen. Das um δ = 2.45 auftretende Multiplett läßt sich einer α-ständigen CH_2-Gruppe bei β-ständigem Hydroxyl zuordnen. Das als Duplett bei δ = 2.2 erwartete Signal für die α-CH_2-Protonen ist auf Grund seiner elektronegativen Umgebung nach höherem Feld verschoben.
Das gefundene Multiplett läßt sich auf Grund einer Wechselbeziehung zwischen Estercarbonyl- und Hydroxylgruppe erklären:



Möglicherweise sind in der Chelatform die beiden Protonen nicht äquivalent, so daß zusätzliche Resonanzen auftreten. Dafür spricht, daß das Multiplett für 2 Protonen integriert.

Eine Signalgruppe um δ = 4.0 war dem Proton am C_3 zuzuordnen und eine weitere um δ = 3.55 dem Proton am C_{12}.

Zum Vergleich nahmen wir das KMR-Spektrum des β-Hydroxy-buttersäuremethylesters auf. Wir fanden, wie bei unserem Säureester, das der α-CH_2-Gruppe entsprechende Signal um δ = 2.45, sowie ein dem Proton am C_3 zuzuordnendes Signal um δ = 4.21, das als Sextett ausgebildet war.

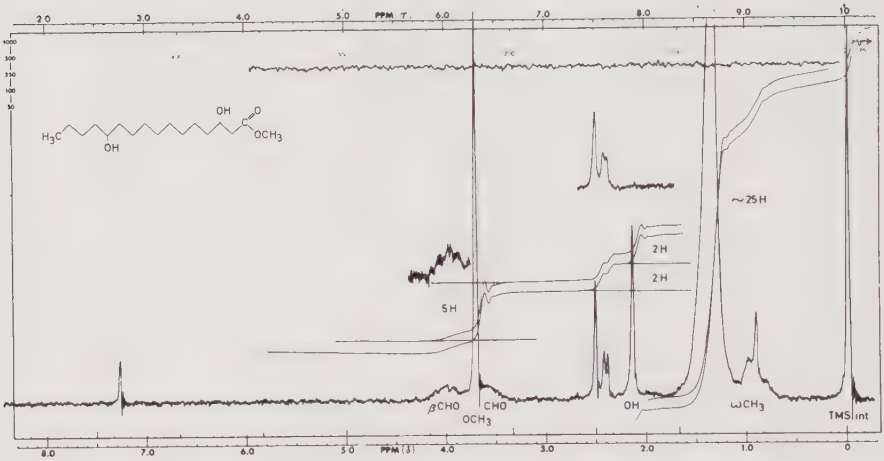


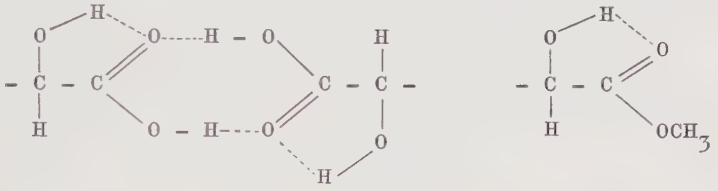
Abb. 6

KMR-Spektrum des 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylesters

2. IR-Spektroskopie

KITAGAWA[37] u. Mitarb. konnten zeigen, daß die Carbonylbande der 12-Hydroxy-stearinsäure bei 1698 cm^{-1} liegt, während die der α-Hydroxy-stearinsäure geringfügig nach 1701 cm^{-1} verschoben ist. Wesentlich stärker ist diese Verschiebung in den niederen Frequenzbereich beim entsprechenden Methylester. Hier liegt die Estercarbonylbande des 12-Hydroxy-stearinsäuremethylesters bei 1742 cm^{-1}, die des α-Hydroxy-stearinsäure methylesters bei 1722 cm-1.

Beide Effekte sind der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zuzuschreiben. Sie ist beim Ester stärker ausgeprägt, da hier nicht, wie bei der entsprechenden freien Säure, zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen auftreten können.



Säure Ester

Die Hydroxylbande beobachteten genannte Autoren beim 12-Hydroxy-stearinsäuremethylester bei 3320 und 3230 cm^{-1}, während die entsprechende α-Verbindung bei 3450 cm^{-1} absorbierte. O'CONNOR[38] führte die beiden unscharfen OH-Banden des 12-Hydroxy-Derivats auf verschiedenartige Wasserstoffbrückenbindungen von Hydroxyl zu Hydroxyl sowie Hydroxyl zu Carbonyl zurück.

Wir nahmen zum Vergleich die IR-Spektren der Methylester der gefundenen Di-hydroxy-palmitinsäure sowie von α-Hydroxy-palmitinsäure und Palmitinsäure auf (siehe Abb. 7, S. 27). Beim α-Hydroxy-palmitinsäuremethylester liegt die Carbonylbande bei 1715 cm^{-1}, während sie beim Palmitinsäuremethylester und dem isolierten Methylester bei 1740 cm^{-1} gefunden wird.

Der α-Hydroxy-palmitinsäuremethylester zeigte eine ausgeprägte Hydroxylbande bei 3450 cm^{-1}, während bei der isolierten Verbindung verhältnismäßig breite OH-Valenzschwingungsbanden bei 3340 und 3420 cm^{-1} auftraten. Da diese Veränderung möglicherweise auch durch die Valenzschwingungen zweier sekundärer alkoholischer Gruppen bedingt ist, kann dieser Befund

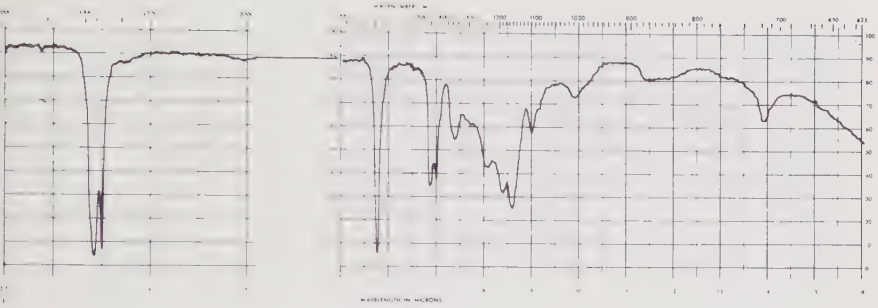
nicht zum Strukturbeweis herangezogen werden. Die im C-O-Deformationsbereich liegenden, für alkoholische Gruppen an Kohlenwasserstoffketten typischen Banden, sowie die Progressionsbanden im Bereich von 1180 - 1350 cm^{-1} lieferten nach Lage und Zahl keine weiteren Aussagen über die Struktur des isolierten Di-hydroxy-palmitinsäuremethylesters.

Auf Grund der gefundenen Carbonyl- und Hydroxylbanden (siehe Tab. 2) ergibt sich nur, daß die von uns isolierte Hydroxyfettsäure keine α-ständige OH-Gruppe besitzen kann.

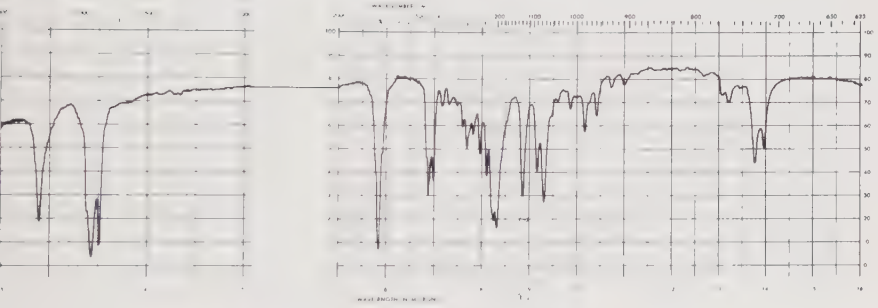
T a b e l l e 2

Carbonyl- und Hydroxylabsorptionsbanden der untersuchten Säuremethylester

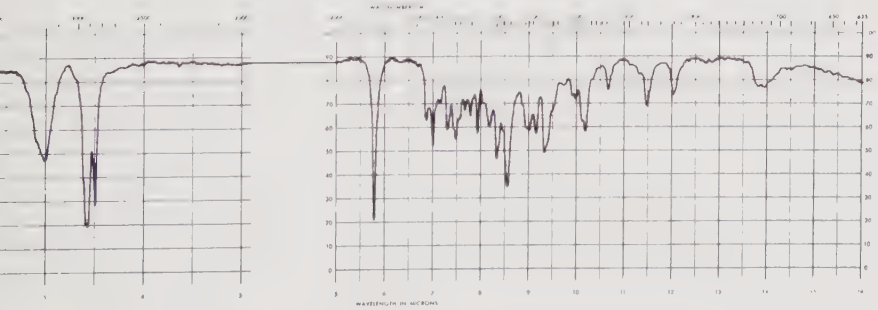
Säuremethylester	Hydroxylbande cm^{-1}	Esterbande cm^{-1}
Palmitinsäuremethylester	-	1740
2-Hydroxy-palmitinsäure-methylester	3450	1715
Di-hydroxy-palmitinsäure-methylester	3340 u. 3420	1740



Palmitinsäuremethylester



α-Hydroxy-palmitinsäuremethylester



3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylester

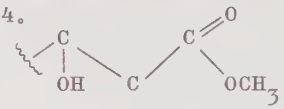
Abb. 7

IR-Spektren der Palmitinsäure-, α-Hydroxy-palmitinsäure- und 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylester

3. Massenspektrometrische Untersuchungen

Der endgültige Strukturbeweis sollte durch das Massenspektrum geführt werden. Von RYHAGE u. STENHAGEN[39)40)] existiert eine zusammenfassende Darstellung über die Massenspektrometrie der Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren und deren Sauerstoffderivate.

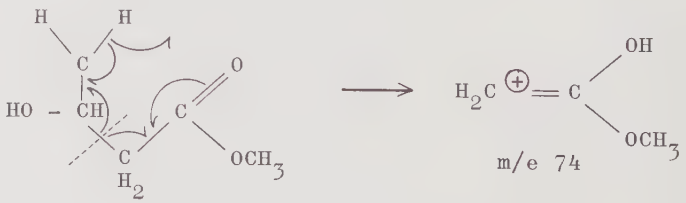
Demnach tritt bei Hydroxysäuren auf Grund der leichten Wasserabspaltung kein Molekularion auf. Analog lieferte unser Hydroxy-fettsäuremethylester nicht das Molekularion M^+ 302, sondern wir fanden in m/e 284 ($=M^+ -18$) das Ion mit der höchsten Massenzahl. Der Hauptpeak m/e 103 entsteht durch Bindungsbruch zwischen dem C-Atom 3, das die OH-Gruppe trägt und dem C-Atom 4.



m/e 103

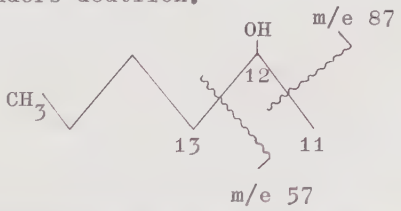
Dieses Bruchstück ist charakteristisch für einen β-Hydroxyfettsäuremethylester. Ein weiterer intensiver Peak bei m/e 74 ist typisch für einen Fettsäuremethylester, der am C_2 nicht substituiert ist.

Das Ion entsteht beim Bruch der C_2-C_3-Bindung unter gleichzeitiger Wanderung eines H-Atoms vom abgespaltenen Fragment an die Carbonylgruppe.



McLAFFERTY-Umlagerung des Methylesters

Diese Ionen wurden bereits von HAPP u. STEWART[41] in den Massenspektren kurzkettiger Fettsäuren (als m/e 60) beobachtet. Der Mechanismus ihrer Entstehung aber konnte erst durch McLAFFERTY[42] gedeutet werden. Er fand, daß diese Protonenwanderung immer dann stattfindet, wenn sich in γ-Stellung zu einer Doppelbindung-hier das Carbonyl - ein Wasserstoff befindet. Daß der Wasserstoff ausschließlich von der CH_2-Gruppe am C_4 kommt, bewiesen DIN NGUYEN, RYHAGE, STÄLLBERG-STENHAGEN u. STENHAGEN[43] durch Aufnahme einer Reihe von Massenspektren von Fettsäuremethylestern,bei denen sie jeweils eine CH_2-Gruppe durch eine CD_2-Gruppe ersetzt hatten. In beschränktem Maße wandern auch 2 H-Atome, wie der Peak bei m/e 75 beweist. Er erscheint stärker, als für einen Isotopenpeak typisch. Bei Vorliegen einer α-Hydroxy-fettsäure müßte dieser Peak die Massenzahl m/e 90 haben. Ein entsprechendes Signal war in unserem Spektrum jedoch nicht aufzufinden. In dem Massenspektrum waren noch die Ionen m/e 57 und 87 besonders deutlich.



Wie aus dem Schema ersichtlich, müssen sie durch Fragmentierung zwischen dem die zweite OH-Gruppe tragenden C_{12} und dem ihm benachbarten C_{11} bzw. C_{13} entstanden sein.

Die Peaks bei m/e 28,41,55 und 69 sind wenig charakteristisch und rühren allgemein von der Kohlenwasserstoffragmentierung her.

Die aufgefundenen Signale beweisen eindeutig, daß es sich bei der von uns analysierten Substanz um eine 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure handelt.

Zur Vervollständigung der massenspektrometrischen Untersuchungen wurde noch das Massenspektrum des silyerten Di-hydroxy-säuremethylesters aufgenommen (siehe Abb. 9, S. 31).

Wir fanden das Molekularion m/e 446, ferner die durch Bindungsbruch am C_{12}-Trimethylsilyläther entstandenen Ionen m/e 57, m/e 159 und m/e 389 sowie die durch Bindungsbruch am C_3-Trimethylsilyläther gebildeten Ionen m/e 175 und 373.

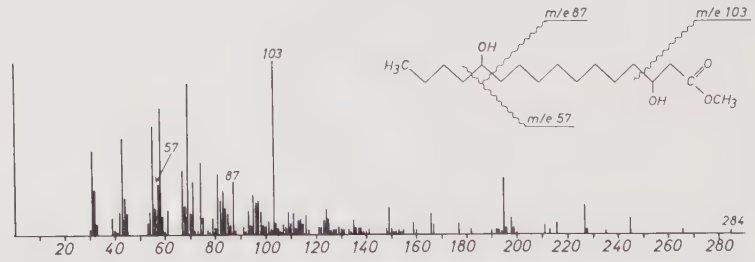


Abb. 8

Massenspektrum des 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylesters

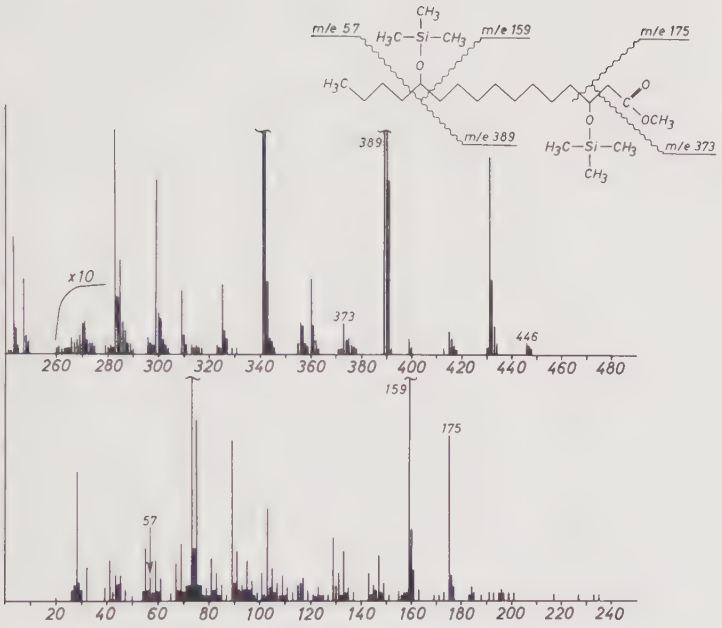


Abb. 9

Massenspektrum des silylierten 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure-methylesters

4. Chromatabbau

Zur chemischen Beweisführung führten wir einen Chromatabbau nach MATIC[44] und MAEKINS u. SWINDLESS[45] durch. Die Hydroxysäure wird im schwach Sauren zunächst zur Ketosäure oxidiert. Bei weiterem Einwirken des Oxidationsmittels bricht die Kette an beiden Seiten der Ketogruppe. Es bilden sich die entsprechenden Mono- und Dicarbonsäureesterpaare. Um die bei α- und β-Ketosäuren leicht eintretende Decarboxylierung zu verhindern, wurde die Säure in Form des Methylesters der Oxidation unterworfen, da dieser, wie MATIC[44] gezeigt hat, unter den

gewählten Bedingungen nur geringfügig verändert wird. Im Falle der 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure verläuft der Abbau wie aus dem Schema (siehe Abb. 10, S. 33) ersichtlich.

Zur Identifizierung der gebildeten Säuren und Dicarbonsäuren extrahierten wir mit Äther, methylierten nach POHL, GLASL u. WAGNER[46] mit Diazomethan und untersuchten die Ester gaschromatographisch.

Wie aus den abgebildeten Gaschromatogrammen (siehe Abb. 11, S. 34) hervorgeht, fanden wir die Dimethylester der C_8-, C_9- und C_{10}-Dicarbonsäuren. Beide Hydroxylgruppen sind demnach durch 8 C-Atome getrennt. An Monocarbonsäuren fanden wir n-Buttersäure und n-Valeriansäure (siehe Abb. 12, S. 35). Das Kettenende besteht somit aus 4 C-Atomen. Die ebenfalls entstandenen Oxal- und Malonsäuremonomethylester konnten nicht nachgewiesen werden, da sie in Säuren stark oxidationsempfindlich sind und durch den zur quantitativen Oxidation benötigten Chromsäureüberschuß in CO_2 und H_2O übergeführt werden.

Damit ist ebenfalls die von VOTOCEK u. PRELOG[8] angegebene Struktur der 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure bestätigt.

Chromatabbau der 3,12-Di-Hydroxypalmitinsäure

(nach Maekins)

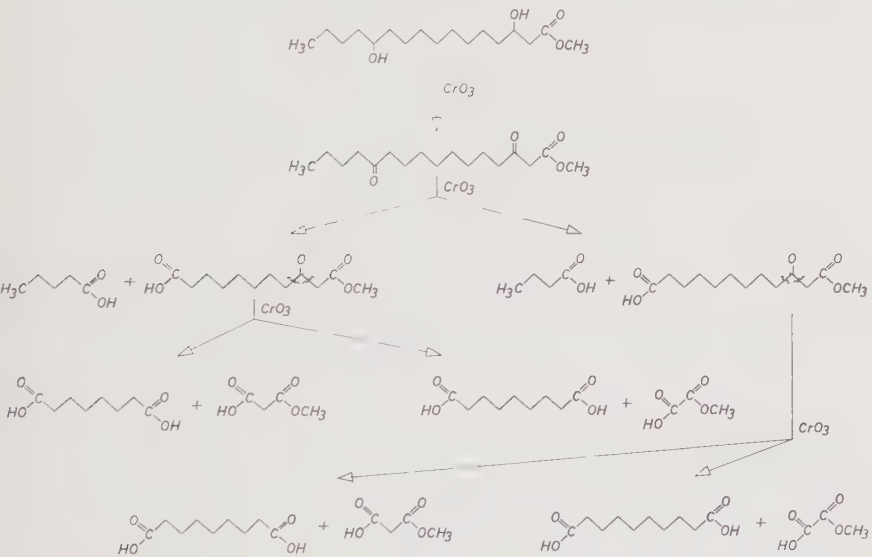


Abb. 10

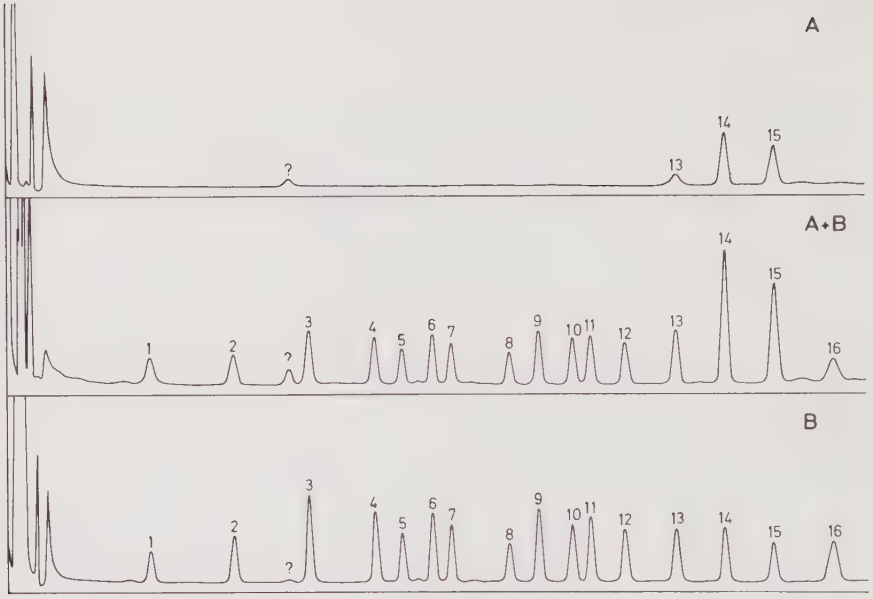


Abb. 11

Gaschromatographie der gefundenen Dicarbonsäuremethylester
Reoplex 15% 50° - 190°C 2°C/Min
A = gefundene Dicarbonsäuremethylester B = Testlösung

1 = C_6-Monocarbonsäuremethylester
2 = C_7-Monocarbonsäuremethylester
3 = C_8-Monocarbonsäuremethylester
4 = C_9-Monocarbonsäuremethylester
5 = C_3-Dicarbonsäuredimethylester
6 = C_{10}-Monocarbonsäuremethylester
7 = C_4-Dicarbonsäuredimethylester
8 = C_5-Dicarbonsäuredimethylester
9 = C_{12}-Monocarbonsäuremethylester
10 = C_6-Dicarbonsäuredimethylester
11 = C_{13}-Monocarbonsäuremethylester
12 = C_7-Dicarbonsäuredimethylester
13 = C_8-Dicarbonsäuredimethylester
14 = C_9-Dicarbonsäuredimethylester
15 = C_{10}-Dicarbonsäuredimethylester
16 = C_{11}-Dicarbonsäuredimethylester

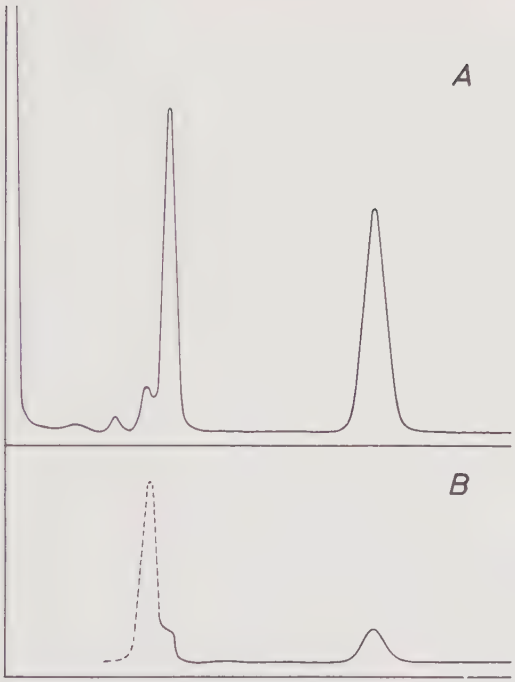


Abb. 12

Gaschromatographie der Methylester der beim Chromatabbau gefundenen Monocarbonsäuren
Reoplex 15% Säulentemp.: 40°C

A = n-Buttersäure und n-Valeriansäure als Test
B = Beim Chromatabbau gefundene Monocarbonsäuren

IV. Aufklärung der Verknüpfungsweise von Zucker und Hydroxyfettsäure

Im folgenden war zu klären, ob der Zuckeranteil mit beiden Hydroxylgruppen verbunden ist, wie bisher angenommen wurde[9] oder aber nur mit einer Hydroxylgruppe verknüpft ist.

KAWASAKI[17], der, wie eingangs erwähnt, die Struktur der ähnlich gebauten Pharbitinsäuren C und D aufklären konnte, oxidierte das Glykosid mit Natriumdichromat und führte anschließend eine saure Hydrolyse durch. Er fand ein 2-Keto-10-hydroxy-tridecan. Der Zuckeranteil war somit mit der Hydroxygruppe am C_{11} der ursprünglichen 3,11-Di-hydroxy-tetradecansäure verknüpft.

Um den Ort der glykosidischen Bindung zu ermitteln, mußte ein Verfahren gewählt werden, bei dem alle vorhandenen alkoholischen Gruppen zu Ketogruppen oxidiert, glykosidische Bindungen jedoch nicht gespalten werden. Anfängliche Versuche mit einer Lösung von Chromat in Pyridin nach SARRET[47] oder Pyridin und Wasser nach CORNFORTH[48] scheiterten. Wir konnten das gebildete Oxidationsprodukt nicht aus dem Reaktionsgemisch isolieren. Wir wandelten deshalb die von MATIC[44] zur Oxidation von Hydroxyestern beschriebene Methode der Chromatoxidation im Sauren ab, indem wir eine den zahlreichen Zuckerhydroxygruppen entsprechende CrO_3-Menge verwendeten. Wir oxidierten den Methylester, um eine Decarboxylierung zu vermeiden. Nach zwölfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Chromatüberschuß mit Methanol reduziert, Schwefelsäure bis zur Normalität zugegeben und 3 Stdn. am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser verdünnt und der gebildete Keto-hydroxysäuremethylester mit Chloroform ausgeschüttelt. Um etwa entstandene freie Säuren zu verestern, wurde nach POHL, GLASL u. WAGNER[46] mit Diazomethan nachmethyliert und das Reaktionsprodukt dann dünn-

schichtchromatographisch untersucht. Wir fanden auf Kieselgel H/Pyranin-Platten im Laufmittel Äther-Petroläther(3:7)einen mit Dinitrophenylhydrazin positiv reagierenden Fleck vom R_f: 0.45, der zwischen den Methylestern der Mono- und Di-hydroxy-carbonsäuren lag. Es konnte sich also um einen Keto-hydroxy-fettsäuremethylester handeln. Zur weiteren Untersuchung wurde die Substanz mittels präparativer Dünnschichtchromatographie im oben beschriebenen System isoliert.
Das IR-Spektrum (in Chloroform) zeigte eine gegenüber der 3,12-Di-hydroxypalmitinsäure reduzierte Hydroxylbande (3450 cm^{-1}), eine Estercarbonyl- (1745 cm^{-1}), eine Ketocarbonyl- (1730 cm^{-1}) und eine einer β-Hydroxy-α,β-ungesättigten Estercarbonyl zugehörige Bande (1650 cm^{-1}) (siehe Abb. 13), die auch beim Acetessigsäureäthylester beobachtet werden kann. Das NMR-Spektrum zeigte neben der Estermethylgruppe (δ = 3.65 ppm) die α-ständige Methylengruppe (δ = 3.72 ppm). Somit ist erwiesen, daß die isolierte Substanz ein 3-Keto-12-hydroxy-palmitinsäuremethylester ist. Der Zuckeranteil muß demzufolge an die am C_{12} befindliche Hydroxylgruppe glykosidisch gebunden sein.

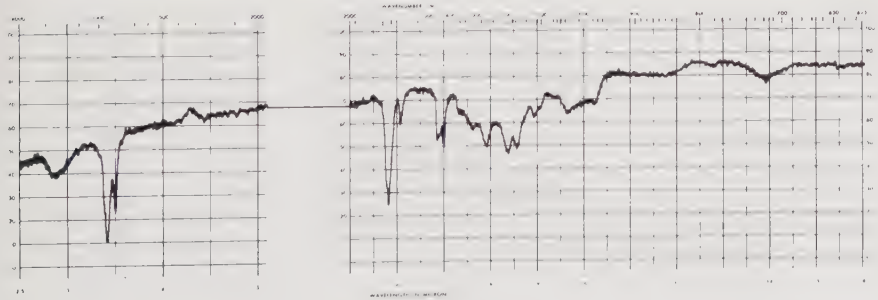


Abb. 13

IR-Spektrum des 3-Keto-12-hydroxy-palmitinsäure-methylesters

V. Untersuchungen zur Struktur des Zuckeranteils

1. Verknüpfung der Zucker untereinander

a) Permethylierung

Nachdem die quantitativen Untersuchungen für den Oligosidteil ein Glucose-Rhamnose-Verhältnis von 4:2 ergeben hatten und durch Oxydation der Nachweis erbracht worden war, daß alle 6 Zuckereinheiten hintereinander an eine Hydroxylgruppe der Fettsäure gebunden sein mußten, waren nur noch die Sequenz und die verschiedenen Bindungsweisen der Zucker zu ermitteln.

Als Methode der Wahl bietet sich die Permethylierung an. Voraussetzung ist eine quantitative Permethylierung der freien Hydroxylgruppen des Polysaccharides, ohne daß dabei Glykosidbindungen gespalten werden. Nach anschließender Hydrolyse wird das Gemisch der Methylzucker getrennt und die einzelnen Methylzucker identifiziert. Die Position der glykosidischen Bindungen gibt sich im Monosaccharid durch die nach der Spaltung entstehenden freien Hydroxylgruppen zu erkennen.

Nach der Methode von DENHAM u. WOODHAUS[49)] sowie HAWORTH [50)] wird die Substanz mehrmals mit Dimethylsulfat in Gegenwart von Natriumhydroxyd behandelt. PRURDIE u. IRVIN[51)] setzten den Zucker wiederholt mit siedendem Methyljodid und Silberoxyd als Katalysator um. Es entstanden meist nur partiell methylierte Produkte, die nachmethyliert werden mußten. Die HAWORTH-Methylierung mit nachfolgender PRURDIE-Methode ist sehr zeitraubend, benötigt größere Substanzmengen und führt bei alkalilabilen Verbindungen leicht zur Zersetzung.

Diese Methode erfuhr durch KUHN[52)] und Mitarb. eine wesentliche Verbesserung. Sie benutzten als Lösungsmittel N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, als basischen Katalysator Bariumhydroxyd und Bariumoxid und

als Agens Methyljodid oder Dimethylsulfat. KUHN[53] und Mitarb. beschrieben im Jahre 1963 verschiedene Varianten dieser Methylierungsmethode. SRIVASTAVA[54] und Mitarb. methylierten in N,N-Dimethylformamid mit Methyljodid und benutzten Natriumhydroxyd als Katalysator.

Wir versuchten zunächst die KUHN[53]-Methode, die von AURNHAMMER [55] bei der Methylierung von Flavonglykosiden im Halbmikromaßstab mit Erfolg angewandt worden war. Die Kontrolle auf vollständige Permethylierung erfolgte durch die IR-Spektroskopie. Während wir einfache Disaccharide wie Cellobiose und Maltose ohne Schwierigkeiten in den Permethyläther überführen konnten, gelang es nicht, die Rhamnoconvolvulinsäure mit den oben beschriebenen Verfahren quantitativ zu permethylieren. Wir versuchten daher eine von HAKOMORI[56] entwickelte Methode. Das Polysaccharid wird mit der starken Base Methylsulfinylmethylnatrium in Dimethylsulfoxid umgesetzt. Hierbei werden die Hydroxylgruppen ionisiert und die entstandenen Polyalkoxidionen setzen sich schnell mit Methyljodid um. Entsprechend der Methode von COREY u. CHAYKOVSKY[57] wird das Carbanion durch Auflösen einer gewogenen Menge Natriumhydrid in Dimethylsulfoxid dargestellt. Die zugesetzte Menge Natriumhydrid soll in etwa dem Hydroxylgehalt der zu permethylierenden Substanz äquivalent sein. SJÖBERG[58] zeigte, daß die Reaktion durch Ultrabeschallung begünstigt wird, da diese die Auflösung des Polysaccharides beschleunigt, die Reaktion zwischen Natriumhydrid und Lösungsmittel erleichtert und auch die Reaktion mit Methyljodid begünstigt. Wir arbeiteten nach der von HARIHARAN u. RANGASWAMI[59] beschriebenen Variation, indem wir auf Natriumhydrid Dimethylsulfoxid bei 80°C einwirken ließen, dann das in Dimethylsulfoxid gelöste Polysaccharid dazugaben und das Gemisch wiederum bei 80°C beließen. Nach dem Abkühlen wird dann Methyljodid zugesetzt. Um die Reaktion zu erleichtern, wird die Lösung während des gesamten Reaktionsablaufes gerührt.

Wichtigste Voraussetzung für das Gelingen der Reaktion ist der Ausschluß von Wasser. Wie Untersuchungen von TSCHESCHE u. WULF[60] ergaben, ist speziell beim Einsatz geringer Mengen Glykosides die Reinheit der Reagentien von ausschlaggebender Bedeutung. Da wir von relativ wenig Glykosidsäure ausgingen, mußte Wasser, auch in Spuren, ausgeschlossen werden.

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eiswasser gegossen und mit Chloroform ausgeschüttelt. Um letzte Spuren von Dimethylsulfoxid zu entfernen, wurde der Permethyläther in Äther-Petroläther (1:1) aufgenommen und mit Wasser gewaschen.

Das Dünnschichtchromatogramm zeigte im Laufmittel Benzol-Aceton (2:1) nach dem Besprühen mit Schwefelsäure einen kräftigen Flecken mit dem R_f: 0.69 sowie zwei darunter liegende, eben noch sichtbare Flecken (R_f: 0.51 und 0.41) (siehe Abb. 14).

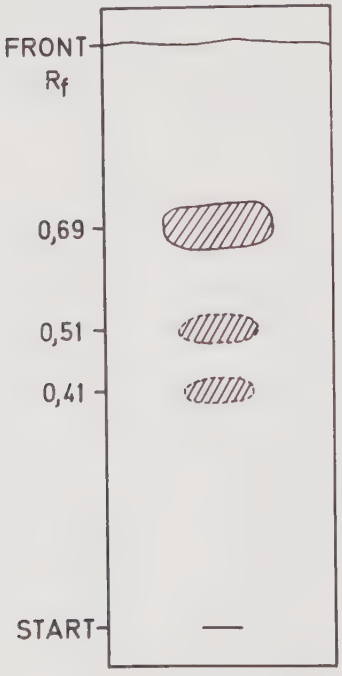


Abb. 14

Dünnschichtchromatographie des Glykosidsäurepermethyläthers

Kieselgel/Pyranin
Benzol-Aceton (2:1)

Da es sich bei den in Spuren gefundenen Substanzen vermutlich um Abbauprodukte handelte, reinigten wir den Glykosidpermethyläther durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel/Pyranin-Platten. Wir erhielten eine hellgelbe harzige Substanz, die im IR-Spektrum keine Banden im Bereich von 3200 - 3700 cm^{-1} zeigte und damit frei von nicht methylierten OH-Gruppen war.

b) Hydrolyse

Die vollständig methylierte Rhamnoconvolvulinsäure ist in Wasser unlöslich. Wir hydrolysierten deshalb in methanolischer Salzsäure bei 80°C. Es entstanden hierbei die Methylglykoside der Methylzucker. Da die Hydrolysedauer für Permethylglykoside gegenüber einfachen permethylierten Disacchariden längere Zeit beansprucht, übernahmen wir die von AURNHAMMER[55] angegebene Vorschrift. Wir hydrolysierten 5 Stdn. in 5%iger methanolischer Salzsäure. Um die freien Methylzucker zu erhalten, muß eine Hydrolyse in wässriger Salzsäure angeschlossen werden. Dieses langwierige Verfahren birgt die Gefahr in sich, daß Methylätherbindungen gespalten werden, so daß leicht Fehlschlüsse über die Verknüpfungsstellen möglich sind. Zudem sind eine Reihe von Zuckermethyläthern relativ stark flüchtig und können beim Entfernen des Methanols im Vakuum verloren gehen. Die wässrige Lösung wird dann mit Dowex 2 (HCO_3^--Form) neutralisiert, das Wasser am Rotationsverdampfer durch azeotrope Destillation mit Äthanol und Benzol entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Wir bevorzugten die Hydrolyse mit methanolischer oder wässriger Salzsäure anstelle von Schwefelsäure, obwohl GAREGG u. LINDBERG[61] gezeigt hatten, daß Schwefelsäure weniger starke Entmethylierung verursacht. Wir fanden nämlich, daß auch Spuren nicht entfernter Schwefelsäure durch teilweise Verkohlung der Substanzen eine weitere Untersuchung unmöglich machen, während Salzsäure abgedampft werden kann. Kontrollversuche mit Permethylmaltose und Permethylrhamnose zeigten, daß unter den gewählten Bedingungen die Abspaltung von Methylgruppen praktisch zu vernachlässigen war.

Günstiger schien uns die von HARIHARAN u. RANGASWAMI[59] zur Hydrolyse verwandte Mischung aus Eisessig, Wasser und Salzsäure nach KILIANI[62]. Der Eisessigzusatz bewirkt eine Lösung des Glycosidsäuremethyläthers, ohne daß Methylglycoside gebildet werden können. Hier konnte nach drei- bis fünfstündiger Hydrolyse die Essigsäure unter vermindertem Druck und

anschließend die Salzsäure mit Ionenaustauschern entfernt werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben. Auch hier wurden Permethylmaltose und Permethylrhamnose praktisch nicht entmethyliert. Bei beiden Hydrolysemethoden fanden wir wie erwartet die gleichen Methylzucker.

c) Trennung von Gemischen methylierter Zucker

Wir führten die Auftrennung des Methylzuckergemisches mit Hilfe chromatographischer Methoden durch. Man muß sich hierbei stets mehrerer Verfahren bedienen, um Fehlschlüsse auszuschließen.

HIRST, HOUGH u. JONES[63] gelang es, Methylzucker p a p i e r c h r o m a t o g r a p h i s c h zu trennen, wobei sie sogar Isomere, wie z.B. 2,4,6- und 2,3,6-Tri-O-methylglucose unterscheiden konnten. Als Standard bezogen sie sich auf 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose mit dem R_{TG}=1. Es handelt sich hier um eine brauchbare Methode Methylzucker, die nach der Hydrolyse von Polysacchariden anfallen, im Halbmikromaßstab zu trennen und zu identifizieren. Allerdings müssen die Methylzucker zum sicheren Nachweis in mindestens zwei Lösungsmittelsystemen getrennt werden. Angewandt wurde diese Methode von RAFIQUE u. SMITH[64], die auf diese Weise die Struktur des ständig wiederkehrenden Bauelements des Guar Gummis, der aus dem Endosperm der in Indien vorkommenden Cyanopsis tetragonaloba und Cyanopsis proraloides gewonnen wird, aufklären konnten.

Wir fanden papierchromatographisch in dem von HIRST, HOUGH u. JONES[63] angegebenen Laufmittel 4 Methylzuckerflecken (siehe Tab. 3, S. 43).

Tabelle 3

R_{TG}-Werte der Methylzucker auf Papier
(Bezugssubstanz 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose)

Substanz	R_{TG}	Farbe
2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose	1.0	rostrot
2,3,6-Tri-O-methylglucose	0.88	braun
2,3,4-Tri-O-methylrhamnose	1.01	grau
Hydrolysat Fleck 1	1.0	grau/rot
Fleck 2	0.90	grau
Fleck 3	0.68	braun
Fleck 4	0.62	braun

Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b
Laufmittel: Butanol-Äthanol-Wasser(5:1:4)Oberphase
Sprühreagens: Anilinphthalat

Dabei könnte es sich bei Fleck 1 um eine Mischung aus 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose und 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose handeln, da beide die gleiche Laufgeschwindigkeit besitzen und die Farbe einer Mischfarbe aus beiden Verbindungen entspricht. Fleck 2 könnte eine Dimethylrhamnose sein, da die graue Farbe und der R_{TG} mit diesem Befund übereinstimmen, während es sich bei Fleck 3 und 4 offenbar um Dimethylglucosen handelt (braune Farbe und R_{TG}).

Wie HAY, LEWIS u. SMITH[65] zeigen konnten, eignet sich auch die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel zur Trennung von Methylzuckern. Wie AURNHAMMER[55] feststellte, ist zur dünnschichtchromatographischen Trennung von Methylzuckern mit ein bis zwei freien Hydroxylgruppen Benzol-Äthanol (8:2) besonders geeignet.

Je nach Aktivierungsgrad der Platten werden die R_f-Werte stark erniedrigt, während die R_{TG}-Werte unverändert bleiben. Es empfiehlt sich also R_{TG}-Werte anzugeben. Wir benutzten luftgetrocknete

Kieselgelplatten und fanden 4 Methylzuckerflecken (siehe Abb. 15). Mit Hilfe von Vergleichssubstanzen konnten wir einen als 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose und einen weiteren als 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose identifizieren. Bei den beiden anderen nahmen wir auf Grund von Laufhöhe und Farbe an, daß es sich um Di-O-methylrhamnose, bzw. Di-O-methylglucosen handeln müsse. Die Ergebnisse von Dünnschicht- und Papierchromatographie stimmen somit überein.

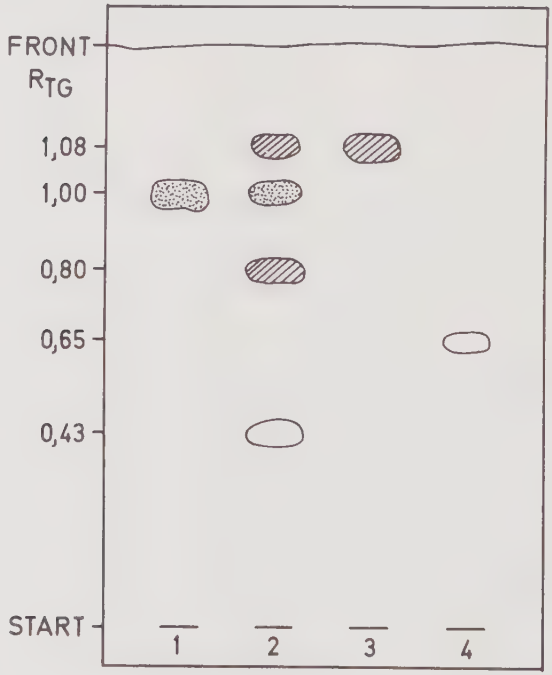


Abb. 15

Dünnschichtchromatographie der Methylzucker
Kieselgel H (nicht aktiviert) Benzol-Äthanol (8:2)
Anilinphthalat

1 = 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose (R_{TG}=1)
2 = Methylzuckergemisch
3 = 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose
4 = 2,3,6-Tri-O-methylglucose

McINNES[66] und Mitarb. zeigten als erste die Brauchbarkeit der Gaschromatographie zur Auftrennung von Methylzuckern. Ihre Methode beschränkte sich noch auf verschiedene permethylierte Zucker. BISHOP u. COOPER[67] erweiterten diese Methode auch auf partiell methylierte Zucker. Hierzu mußten die Zucker in ihre Methylglykoside übergeführt werden, da sie sonst nicht flüchtig genug sind. Jeder methylierte Zucker gibt aber ein oder zwei Paare anomerer Glykoside, je nachdem, ob C_4 oder C_5 oder beide Positionen unsubstituiert sind. Diese Tatsache kann von Vorteil sein, wenn es darum geht, Mischungen aus nur wenigen Zuckern zu untersuchen. Bei komplizierter zusammengesetzten Mischungen ist die Auswertung durch die Vielzahl und eventuelle Überlappung der Peaks erschwert. So gibt ASPINALL[68] die Retentionszeiten einer Reihe von Methylzuckermethylglycosiden bezogen auf Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucosid an. AURNHAMMER[55] konnte freie Methylzucker gaschromatographisch trennen. Ihrer geringen Flüchtigkeit wegen sind aber bereits Di-O-methylzucker nicht mehr nachweisbar und auch die Tri-O-methylderivate geben auf Grund ihrer langen Verweildauer in der Säule keine scharf begrenzten Peaks.

Einen großen Fortschritt brachte die Arbeit von BJÖRNDAL, LINDBERG u. SVENSSON[69]. Sie reduzierten die Carbonylgruppe der Methylzucker mit Natriumborhydrid zur Hydroxylgruppe und acetylierten anschließend, wie dies am Beispiel der Permethylmaltose gezeigt wird (siehe Abb. 16, S. 46). Die so dargestellten Alditolacetate wurden gaschromatographisch auf ECNSS-M-Säulen getrennt. Hierbei verlängert sich die Retentionszeit in dem Maße, in dem Methoxylgruppen durch Acetylgruppen ersetzt werden. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, daß für jedes Methylzuckerderivat nur ein Peak erscheint, da die anomeren Formen durch Reduktion zu den Alkoholen aufgehoben werden, ferner daß ein komplexes Gemisch in einem Arbeitsgang getrennt werden kann. Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode ist ihr außerordentlich geringer Materialbedarf. Da bei den geringen Substanzmengen keine kristallinen Derivate hergestellt werden können, muß die zweifels-

Darstellung der Methylzuckeralditolacetate aus Permethylmaltose

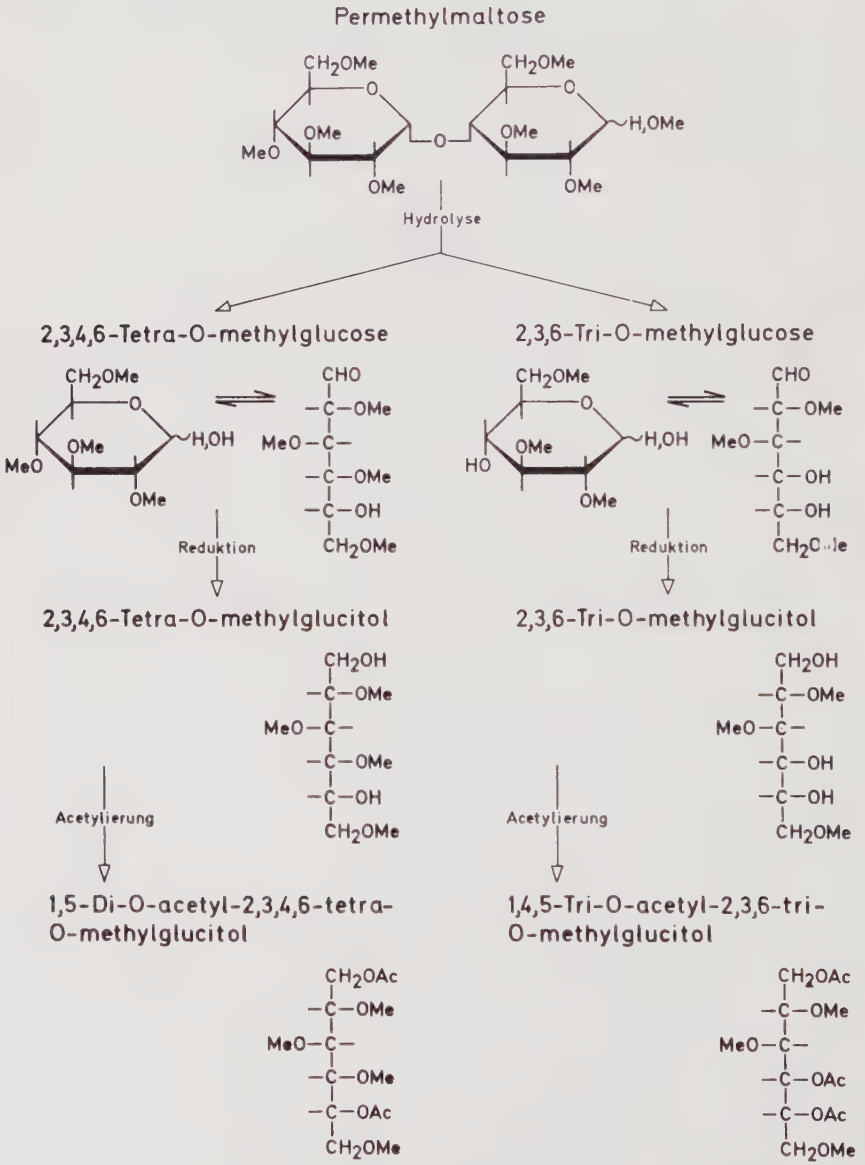


Abb. 16

freie Identifizierung auf anderem Wege erfolgen. BJÖRNDAL, LINDBERG u. SVENSSON[70] erreichten dies durch Aufnahme der Massenspektren. Sie stellten einen Katalog von Massenteilen auf, die bei der Massenspektrometrie von Acetaten der methylierten Alditole entstehen. Damit ist es möglich, nicht beschriebene Massenspektren von Alditolacetaten auf diese Weise zu interpretieren und die zu Grunde liegenden Methylzucker zu identifizieren. Apparative Voraussetzung hierfür ist aber ein mit dem Gaschromatographen gekuppeltes Massenspektrometer. In Ermangelung dieses Geräts mußten wir uns auf die Gaschromatographie beschränken.

BJÖRNDAL, HELLERQUIST, LINDBERG u. SVENSSON[71] untersuchten die Retentionszeiten der verschiedensten Alditolacetate von methylierten Zuckern. Die Reproduzierbarkeit dieser Retentionszeiten, bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol ist gut, wenn man zwei interne Standards verwendet. Wir verwendeten 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (R_{TG}=1) und 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol (R_{TG}=2.5) als interne Standards. Wir fanden im Chromatogramm 4 Peaks (siehe Abb. 17, S. 48) für die wir folgende R_{TG}-Werte ermittelten (siehe Tabelle 4).

T a b e l l e 4

R_{TG}-Werte der Methylzuckeralditolacetate
(Bezugssubstanz: 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol)

Peak	I	II	III
1	0.44	0.42	0.43
2	1.0	0.83	1.0
4	4.01	4.03	4.05
5	5.36	5.4	5.4
2	1.0	0.83	1.0
3	-	2.5	2.5

I = innerer Standard 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucito
II = innerer Standard 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucito
III = graphisch interpoliert aus I und II
Säule: ECNSS-M 3% auf Chromosorb Q - Temp.: 165°C

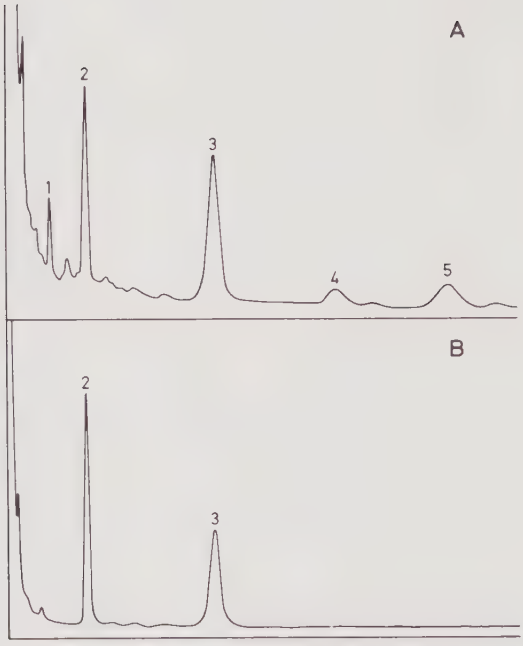


Abb. 17

Gaschromatographie der Methylzuckeralditolacetate
ECNSS - M 3% auf Chromosorb Q Säulentemp. 165°C

A = gefundene Methylzuckeralditolacetate und
1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol
als innerer Standard (3)

B = 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (2)
1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol (3)

Da wir bei der Hydrolyse nur Glucose und Rhamnose gefunden hatten, konnte es sich nur um Alditolacetate von partiell methylierten Derivaten dieser Zucker handeln.

Peak 1 (R_{TG}=0.43) muß demnach
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol (Lit.: R_{TG}=0.44)
sein, nachdem 1,3,4-Tri-O-methylrhamnose bereits dünnschichtchromatographisch nachgewiesen worden war.

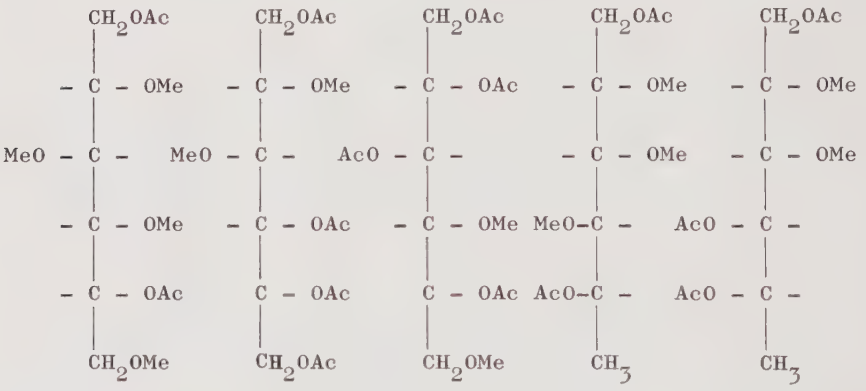
Peak 2 (R_{TG}=1.0) hat einen R_{TG}-Wert, der sowohl mit
1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylrhamnitol (Lit.: R_{TG}=0.98)
als auch
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol (Lit.: R_{TG}=1.0)
übereinstimmt. Da bereits bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie sowohl eine Dimethylrhamnose als auch 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose nachgewiesen worden waren, muß es sich bei Peak 2 um ein Gemisch aus diesen beiden Substanzen handeln.

Durch Peak 4 (R_{TG}=4.03) und Peak 5 (R_{TG}=5.4) sind
1,2,3,5-Tetra-O-acetyl-4,6-di-O-methylglucitol (Lit.: R_{TG}=4.02)
und
1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methylglucitol (Lit.: R_{TG}= 5.39)
nachgewiesen. Auch diese Zuordnung wurde durch den chromatographischen Nachweis von Dimethylglucosen erhärtet.

Quantitative Aussagen waren aus den Gaschromatogrammen praktisch nicht zu gewinnen, da, wie bereits von anderer Seite festgestellt wurde[71], während der Hydrolyse Zersetzungen und Verluste beim Neutralisieren mit Ionenaustauschern und Einengen auftreten. Bei einem Testversuch mit Permethylcellobiose fanden wir z.B. einen um ein Vielfaches höheren Anteil an 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylglucitol als 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol. Man kann aber aus der ungefähr gleichen Peakfläche für die beiden Dimethylglucosederivate, die sich sowohl in ihrer Reaktion gegen Ionenaustauscher als auch in ihrer Flüchtigkeit gleich verhalten dürften, auf gleiche Mengen beider Dimethylglucosen schließen.

Bezieht man die anfangs beschriebenen quantitativen Zuckerbestimmungen in die Ergebnisse dieser Untersuchungen ein, so ergibt sich:

In einem Molekül Rhamnoconvolvulinsäure sind eine endständige und eine in 4-Stellung verknüpfte Rhamnose, sowie zwei endständige, eine in 2- und 3-Stellung und eine in 4- und 6-Stellung verknüpfte Glucose vorhanden.



Schematische Darstellung der gefundenen
Methylzuckeralditolacetate

VI. Acetolyse der Rhamnoconvolvulinsäure und Ermittlung der Zuckersequenz

Zur Klärung der Zuckersequenz müssen Oligosid-Bruchstücke isoliert und identifiziert werden. Hier bietet sich zunächst die partielle Hydrolyse an. Sie wird in der Regel in verdünnten Mineralsäuren oder in organischen Säuren wie Essigsäure, Ameisensäure oder Oxalsäure zwischen 80° und 100°C durchgeführt. Voraussetzung ist, daß das Polysaccharid in der verwendeten Hydrolyselösung löslich ist. Durch Wahl geeigneter Säurelösungen, etwa Methanol oder die bereits erwähnte Kiliani-Mischung können wasserunlösliche Polysaccharide gespalten werden. Gegen diese Behandlung sind 1 ⟶ 2 verknüpfte Zucker sehr labil, während 1 ⟶ 4 verknüpfte stabiler und 1 ⟶ 6 verknüpfte am beständigsten sind, vorausgesetzt, die einzelnen Zucker sind nicht substituiert. So konnte z.B. PERCHERON[72] aus einem Quercetinglycosid mit 0.04 N Schwefelsäure Sophorose abspalten. PEAT, WHELAN u. EDUARDS[73] erhielten bei saurer Hydrolyse von Verbindungen mit 1 ⟶ 2 und 1 ⟶ 6 Verknüpfungen vorwiegend 1 ⟶ 6 Disaccharide. Es ist aber praktisch unmöglich, Voraussagen zu treffen, welche Produkte man aus einem Polysaccharid erhält. Wir versuchten verschiedene partielle Hydrolysen mit stark verdünnter (d.h. 0.01 N bis N-) Salzsäure, Schwefelsäure und organischen Säuren wie Essig- und Ameisensäure. Wir fanden papierchromatographisch stets Glucose und Rhamnose und in einigen Fällen einen weiteren Zuckerfleck, der im Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) (BEW) = Laufmittel A nach dem Besprühen mit Anilinphthalat einen R_G (bezogen auf Glucose) von 1.15 hatte. Außerdem war auffällig, daß wir beim Behandeln mit stark verdünnter Salzsäure einen im Vergleich zur Rhamnose wesentlich intensiveren Glucosefleck fanden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß Rhamnose entweder nicht endständig, oder aber 1 ⟶ 6 verknüpft vorliegt, während die abgespaltene Glucose in einer säurelabileren Verknüpfungsform vorliegt.

Es war uns aber nicht möglich, nach der Säurehydrolyse Oligosidbruchstücke zu isolieren.

Enzymatische Hydrolyseversuche, die wir mit Emulsin aus bitteren Mandeln, α-Glucosidase aus Bierhefe und Naringinase (Fa. Boehringer) durchgeführten, blieben ebenfalls ohne Erfolg.

Ein weiterer Versuch, die Verbindung mit sauren Ionenaustauschern zu hydrolysieren - wir benutzten Dowex 50 (Gegenion H^+) - führte auch zu keinem greifbaren Ergebnis. Wir fanden neben Glucose und Rhamnose wieder einen weiteren Zuckerfleck mit dem R_G 1.15 (BEW, Anilinphthalat).

TULLOCH, HILL u. SPENCER[19], die wie bereits erwähnt aus Torulopsis apicola Cryptococcaceae ein 17-Hydroxyoctadecansäuresophorosid isolierten, spalteten aus dem Octaacetat des Glykosids mit Hilfe von Bromwasserstoff in Eisessig nach anschliessender Entbromierung und Entacetylierung Sophorose ab. Es handelt sich hier um die Acetobromolyse, eine Variante der Acetolyse.

Bei der Acetolyse von Oligosacchariden erhält man die α-Acetate ihrer Bruchstücke, wobei die ursprüngliche Glykosidbindung erhalten bleibt. Im Gegensatz zur Säurehydrolyse sind hier 1 $\longrightarrow$ 6 Verknüpfungen labil und 1 $\longrightarrow$ 2 Verknüpfungen stabil. So erhielten GORIN u. PERLIN[74] bei der Acetolyse eines Schleimpolysaccharides von Saccharomyces rouxii vorwiegend 1 $\longrightarrow$ 2 verknüpfte Bruchstücke, während die 1 $\longrightarrow$ 6 verknüpften zerstört waren. ASPINALL, CHARLSON, HIRST u. YOUNG[75] gewannen vom Arabisch Gummi (Acacia senegal) durch Acetolyse eine Reihe von Oligosaccharidbruchstücken. Nach dem Entacetylieren fanden sie papierchromatographisch Monosaccharide und acht Oligosaccharide. Über Säulenchromatographie an Kohle-Celite konnten sie ein Disaccharid isolieren, das sie als 4-O-α-Rhamnopyranosylglucosid identifizierten.

Wir lösten entweder die freie Glykosidsäure oder ihr Acetat in Essigsäureanhydrid und gaben unter Kühlung Schwefelsäure dazu. Die Reaktionslösung ließen wir über Nacht bei Raumtempe-

ratur stehen, gossen das inzwischen grün verfärbte Reaktionsprodukt auf Eiswasser und schüttelten mit Chloroform aus.

Bei der Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Benzol-Äthylacetat(5:4)fanden wir 6 Flecken, die wir als Zuckeracetat A - F bezeichneten (siehe Abb. 18, S. 54).

Nach dem Entacetylieren fanden wir im Laufmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) nach dem Besprühen mit Anilinphthalat neben Glucose und Rhamnose vier weitere Zuckerflecken, die wir als Zucker I - IV bezeichneten. (siehe Abb. 19, S. 55).

Mit Hilfe der präparativen Kieselgel-Säulenchromatographie und Benzol-Äthylacetat (5:4) als Elutionsmittel konnten die Zuckeracetatflecken A und B als Gemisch erhalten werden. Wir entacetylierten in der Kälte mit Natriummethylatlösung und fanden papierchromatographisch Glucose und Rhamnose. Die zur Kontrolle hergestellten α-Acetate von Glucose und Rhamnose verhielten sich chromatographisch wie die isolierten Substanzen.

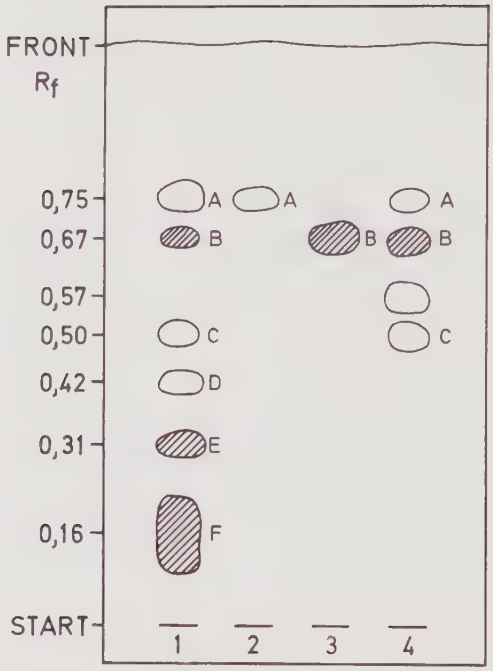


Abb. 18

Dünnschichtchromatographie der Acetolyseprodukte der Rhamnoconcolvulinsäure

D - F = Oligosaccharidacetate nach Acetolyse

1 = Acetolyseprodukt
2 = Rhamnoseacetat
3 = Glucoseacetat
4 = Acetolyse Scillaren A

Kieselgel H
Benzol-Äthylacetat (5:4)
schraffiert: schwarz
weiß: braun

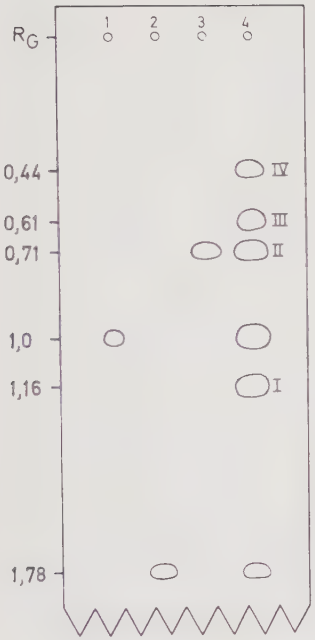


Abb. 19

Papierchromatographie der freien Zucker nach Acetolyse

Papier: 2043 b (Schleicher u.Schüll)
Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)
Anilinphthalat

1 = Glucose
2 = Rhamnose
3 = Laminaribiose
4 = freie Zucker nach Acetolyse (Fleck I - IV)

Der Zuckeracetatfleck C gab nach dem Entacetylieren immer Glucose und Rhamnose. Das NMR-Spektrum des Acetatflecks zeigte, daß es sich um ein Gemisch aus zwei Acetaten handeln mußte (Integration der Protonen am anomerischen C-Atom). Acetolyseversuche, die wir mit Scillaren A, das Rhamnose und Glucose enthält, durchführten, lieferten unter anderem einen kräftigen Fleck mit dem gleichen R_f-Wert (siehe Abb. 18, S. 54). Es muß sich somit um ein sekundär entstandenes, locker gebundenes Acetatgemisch aus Glucose und Rhamnose handeln.

Der Zuckeracetatfleck D konnte rein erhalten werden. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol erhielten wir plättchenförmige Kristalle mit dem Schmelzpunkt 60°C. Wir entacetylierten mit Natriummethylatlösung und fanden papierchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln nur einen Fleck, der immer über der als Bezugssubstanz aufgetragenen Glucose lag (siehe Tab. 5).

Tabelle 5

Papierchromatographie des Freien Zuckers I

Laufmittel	R_G
A) Butanol-Eisessig-Wasser(4:1:2)	1.16
B) Äthylacetat-Eisessig-Ameisensäure-Wasser(18:3:1:4)	1.11
C) Propanol-Äthylacetat-Wasser(7:1:2)	1.20
D) Äthylacetat-Pyridin-Wasser(10:4:3)	1.25

Entsprechend der Laufhöhe von Acetat und freiem Zucker, konnte es sich nur um ein Disaccharid handeln. Die Integration der Protonen im NMR-Spektrum des Acetats ließ, bezogen auf die CH_3-Gruppe der Rhamnose, ebenfalls auf ein Disaccharid schliessen. Bei saurer Hydrolyse fanden wir Glucose und Rhamnose. Im Laufmittel A lief der Zucker höher als Rutinose = 6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose (aus Rutin) R_G = 0.77, Neohesperidose = 2-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranosid R_G = 0.89 und Scillabiose = 4-O-β-Glucopyranosyl-L-rhamnopyranose, die wir aus Scillaren*) A durch Acetolyse dargestellt hatten, R_G = 1.0. Auch hatte der von uns isolierte Zucker in den Laufmitteln B, D und E andere Laufstrecken als die von ASPINALL, CHARLSON, HIRST u. YOUNG[75] isolierte 4-O-α-Rhamnopyranosylglucose.

Wir reduzierten das entacetylierte, über Sephadex G_{15} gereinigte und gefriergetrocknete Disaccharid nach BJÖRNDAL, LINDBERG u. SVENSSON[69] mit Natriumborhydrid und hydrolysierten anschliessend mit N-wässriger Salzsäure 12 Stdn. bei 100° in einer Ampulle. Wir konnten papierchromatographisch mit Anilinphthalat nur Glucose nachweisen, die Rhamnose war zum Rhamnitol reduziert. Es mußte sich um eine Glucosylrhamnose handeln. Da wir nach der Permethylierung nur 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylrhamnitol gefunden hatten, und da das Disaccharid sich chromatographisch nicht mit Scillabiose identisch verhielt,

*) Für die freundliche Überlassung der Testsubstanz danken wir der Fa. Knoll.

dürfte es sich um 4 - O - β - G l u c o p y r a n o s y l - r h a m n o s e handeln. Das isolierte und über Sephadex gereinigte, nicht kristallisierbare Disaccharid hatte einen Schmelzbereich von 126 - 130°C.
Den Zuckeracetatflecken E konnten wir ebenfalls rein isolieren.

Nach dem Entacetylieren fanden wir papierchromatographisch mit dem üblichen Sprühreagens im Laufmittel A einen Zuckerfleck (R_G = 0.71), der stets mit Glucose verunreinigt war. Nach saurer Hydrolyse fanden wir nur Glucose. Da auch hier die Laufhöhe sowohl des Acetats als auch der freien Verbindung im Disaccharidbereich lagen und die Integration der Protonen im NMR-Spektrum auf ein Disaccharid schließen ließ, mußte es sich um eine Glucobiose handeln. OUGH[76] gelang es, alle 11 möglichen Glucobiosen mit Hilfe von zwei Laufmitteln papierchromatographisch zu unterscheiden. Wir konnten das gefundene Disaccharid als Laminaribiose (=3-O-β-Glucopyranosylglucopyranose) identifizieren und dieses Ergebnis mit Originalsubstanz*) belegen (siehe Tab. 6).

T a b e l l e 6

Papierchromatographisch gefundene R_M-Werte des isolierten Disaccharides und der Laminaribiose (Bezugssubstanz: Maltose)

Laufmittel	Disaccharid	Laminaribiose	Lit.
F	1.25	1.25	1.25
C	1.22	1.22	1.27

Auch der gefundene Schmelzpunkt des α-Acetats, bei der Acetolyse entstehen stets α-Acetate, von 78 - 79°C und die beobachtete opt. Drehung [α] D = +20.1 ($CHCl_3$, c = 1.4, 22°C) stimmen mit den von BÄCHLI u. PERCIVAL[77] angegebenen Daten (Schmp.: 77 - 78°C) [α] D $CHCl_3$ = +20.0) überein. Somit war sichergestellt, daß das isolierte Disaccharid L a m i n a r i b i o s e ist. Auf Grund der 1 ⟶ 3 Verknüpfung, die besonders alkalilabil ist, fanden wir beim Entacetylieren neben Laminaribiose immer Glucose.

*) Wir danken Herrn Prof. Stanley Peat , der die Laminaribiose aus Laminarin isolierte, für die Überlassung der Testsubstanz.

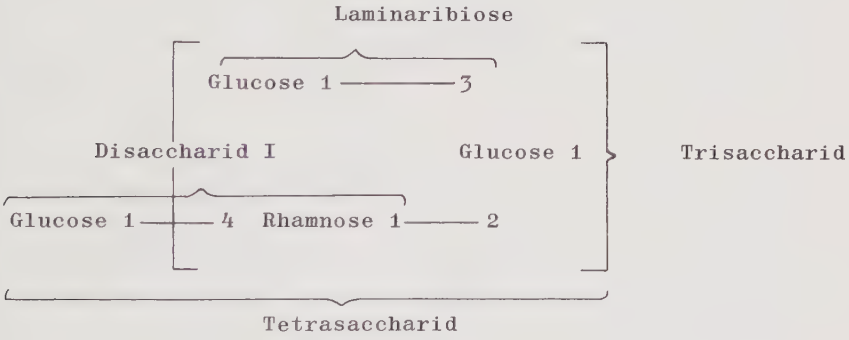
Bei der Entacetylierung des Zuckeracetats F fanden wir auf dem Papierchromatogramm ein Gemisch aus den Zuckern II und III (siehe Abb. 19, S. 55) sowie Glucose. Bei der sauren Hydrolyse entstanden Glucose und Rhamnose. Wir permethylierten das freie Zuckergemisch und erhielten nach der geschilderten Aufbearbeitung die gleichen Methylzuckeralditolacetate wie bei entsprechender Behandlung des Gesamtglykosids, mit Ausnahme des 1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methylglucitols. Wir unterwarfen das Gemisch einer erneuten Acetolyse, die das gleiche Chromatogrammbild der Acetate wie die Acetolyse des Ausgangsmaterials ergab. Auf der Suche nach einem Oligosaccharid, das neben Laminaribiose noch 1 Mol Rhamnose enthält, stießen wir auf das von SOSA u. PERCHERON[78] beschriebene Trisaccharid 2^1-α-L-rhamnopyranosyllaminaribiose. Auch diese Autoren fanden nach der Permethylierung ihres Glykosids 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose, 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose und 4,6-Di-O-methylglucose. SOSA gibt die R_G-Werte (Bezugssubstanz Glucose) des Trisaccharides in 4 Laufmitteln an. Der Zuckerfleck III hatte in allen 4 Laufmitteln (G, H, I u. K) mit dem von SOSA beschriebenen Trisaccharid gleiche Laufhöhe, während der Zuckerfleck IV stets tiefer lag (siehe Tab. 7). Bei dem Zucker III dürfte es sich demnach um 2^1-α-L-Rhamnopyranosyllaminaribiose handeln.

Tabelle 7

Papierchromatographie der Zucker III u. IV (Bezugssubstanz: Glucose R_G = 1.0)

Zucker	R_G	im Lösungsmittel		
	G	H	I	K
Trisaccharid SOSA	0.56	0.59	0.66	0.52
Zucker III	0.56	0.58	0.69	0.51
Zucker IV	0.35	-	0.58	0.31

Da wir bei der Permethylierungsanalyse des Zuckergemisches neben 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol auch 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylrhamnitol fanden, muß demnach die endständige Rhamnose der 2^1-α-L-rhamnopyranosyllaminaribiose in 4-Stellung mit Glucose zu einem Tetrasaccharid verknüpft sein. Diese 1 ⟶ 4 verknüpfte Glucopyranosylrhamnose konnten wir als gesondertes Bruchstück isolieren, wir haben es als Disaccharid I beschrieben.

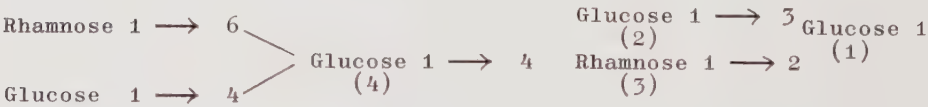


Verknüpfung der gefundenen Zuckerbruchstücke

Wie auf Grund der gefundenen Methylzucker ersichtlich, muß eine der beiden endständigen Glucosen des Tetrasaccharides in 4- und 6-Stellung mit weiteren Zuckern verknüpft sein. Wir reicherten auf der Suche nach weiteren Bruchstücken die Disaccharide, die wir nach der Acetolyse erhalten hatten, über Sephadex G 15 an. In der so erhaltenen Disaccharidfraktion fanden wir in geringen Mengen Maltose (= 4-O-α-D-L-Glucopyranosyl-D-glucopyranose) und in Spuren Rutinose (= 6-O-α-L-Rhamnopyranosyl-D-glucopyranose).

Eine der beiden endständigen Glucosen ist deshalb in 4-Position mit Glucose und in 6-Position mit Rhamnose verknüpft.

Wir nehmen an, daß bei der Acetolyse von Oligosacchariden die einzelnen Zucker vom Oligosidende zum Aglukon abgespalten werden. Da die 1 ⟶ 6 verknüpfte Rutinose ohnehin bei der Acetolyse sehr leicht gespalten wird, konnten wir sie nur in Spuren finden. Auch die relativ stabile 1 ⟶ 4 verknüpfte Maltose konnte nur in geringen Mengen gefunden werden. Die beschriebenen Tetra- und Trisaccharide, sowie das Disaccharid I fanden wir in gut nachweisbaren Mengen. Am meisten war die, von uns auch isolierte, Laminaribiose vorhanden. Wären die endständigen Glucose und Rhamnose an die Laminaribiose gebunden, so hätten wir, da die 1 ⟶ 4 Verknüpfung relativ stabil ist, zumindest in Spuren, ein Triglucosid finden müssen. Im Falle der Verknüpfung mit der anderen endständigen Glucose des Tetrasaccharides (Glucose 4 im Schema) ist es unwahrscheinlicher ein entsprechendes Bruchstück aufzufinden. Wir schlagen deshalb folgendes Verknüpfungsschema vor:



D. Diskussion

Nachdem bislang von den Glykosidsäuren der Convolvulaceen nur Muricatin B und Pharbitinsäure in ihrer Struktur geklärt waren, ist es uns gelungen, die Struktur der Rhamnoconvolvulinsäure als dritter Glykosidsäure dieser Pflanzenfamilie zu klären, wobei lediglich eine Verknüpfung des Oligosids nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden konnte.

Die Rhamnoconvolvulinsäure stimmt mit den anderen beiden Glykosidsäuren darin überein, daß die OH-Gruppe einer OH-Fettsäure, die das Aglukon darstellt, mit dem Zuckeranteil verbunden ist.

Wie bei der Pharbitinsäure ist nur eine OH-Gruppe einer Di-hydroxy-fettsäure mit dem Zuckeranteil verbunden, und wie bei der Pharbitinsäure ist auch in unserem Falle die β-ständige OH-Gruppe des Aglukons frei. Beide Glykosidsäuren unterscheiden sich jedoch in ihrem Zuckeranteil. Bei der Pharbitinsäure sind Rhamnose, Glucose und Quinovose zu einem Pentasaccharid verknüpft, während der von uns untersuchte Zuckeranteil ein Hexasaccharid aus Rhamnose und Glucose darstellt.

Um in Zukunft Verwechslungen vorzubeugen, schlagen wir vor, die Glykosidsäure auf Grund ihrer Herkunft Operculinsäure zu nennen.

Wir finden uns mit diesem Vorschlag in einer gewissen Übereinstimmung mit SHELLARD[14], der die 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäure, das Aglukon der von uns untersuchten Glykosidsäure, als Operculinolsäure bezeichnete.

Als Ergebnis unserer Untersuchungen machen wir für die Operculinsäure nachstehenden Strukturvorschlag:

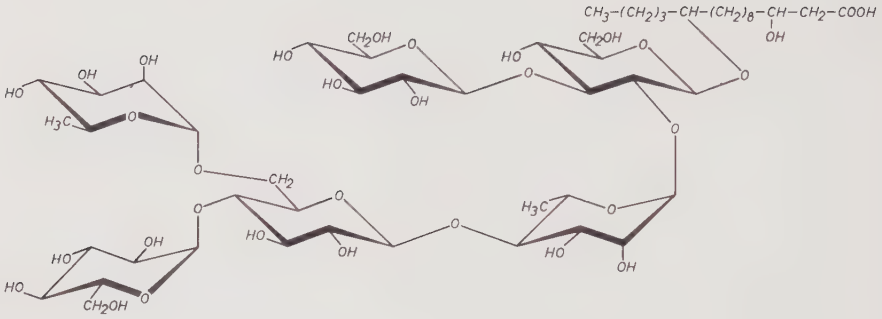


Abb. 20

Operculinsäure
(Rhamnoconvolvulinsäure)

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Herkunft der Droge

Die Droge wurde als Resina Jalapae DAB 6 von der Firma Louis Duvernoy Nachf., Stuttgart, bezogen.

B. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, durchgeführt.
Temp.: 20 - 24°C
Laufzeit: 24 - 120 Stdn.

1. Laufmittel

a) Zucker

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) (= Laufmittel A)
Äthylacetat-Eisessig-Ameisensäure-Wasser (18:3:1:4) (= Laufmittel B)
n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (7:1:2) (= Laufmittel C)
Äthylacetat-Pyridin-Wasser (10:4:3) (= Laufmittel D)
n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase) (= Laufmittel E)
Äthylacetat-Pyridin-Wasser (8:2:1)(= Laufmittel F)
n-Butanol-Pyridin-Wasser (9:5:4) (= Laufmittel G)
n-Butanol-iso-Propanol-Wasser (1:7:2) (= Laufmittel H)
iso-Propanol-Methyläthylketon-Äthylacetat-n-Butanol-Wasser (6:5:3:2:5) (= Laufmittel I)
Äthylacetat-n-Butanol-Pyridin-Wasser (8:9:7:5) (= Laufmittel K)

b) Methylzucker

n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase)

2. Sprühmittel für Zucker und Methylzucker
Anilinphthalatlösung (0,93 Anilin und 1,66 Phthalsäure werden in 100.0 ml wassergesättigtem Butanol gelöst. Nachbehandlung: Einige Minuten auf 105°C erhitzen.

II. Dünnschichtchromatographie

1. Adsorbens
14.0 Kieselgel H der Fa. Merck wurden mit 45.0 Wasser angerührt und auf 5 Glasplatten 10 x 20 cm ausgestrichen. Die Platten wurden 30 Min bei 120°C aktiviert.

Zur Herstellung von Pyranin Fluoreszenzplatten wurden 14.0 Kieselgel H, 5.0 mg Pyranin (= 3-Hydroxy-Pyren-5,8, 10-Trisulfonsaures Natrium) zugesetzt und die Platten wie üblich beschichtet.

Zur Chromatographie der Methylzucker wurden nicht aktivierte luftgetrocknete Platten verwendet.

2. Laufmittel
a) Glykolipide:
Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)
Isopropanol-Ammoniak 10% (2:1)

b) Glykosidacetate:
Benzol-Aceton (1:1)

c) Fettsäuren und Ester:
Äther-Petroläther (7:3 bzw. 3:7)
Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2)

d) Methylzucker:
Benzol-Äthanol (8:2)

e) Zuckeracetate:
Benzol-Äthylacetat (5:4)

3. Sprühreagenzien

a) Glykolipide

0,006%ige wässrige Rhodamin 6 G-Lösung und 2N Natronlauge (1/1 v/v) Mischung stets frisch bereitet
Nachbehandlung: Sofort im UV-Licht betrachten.

b) Glykolipid-Acetate

50%ige äthanolische Schwefelsäure
Nachbehandlung: Erhitzen auf 110°C

c) Fettsäuren und Ester

Betrachten im UV-Licht (360 mμ): Erscheinen blau auf blau-grünem Grund.

d) Methylzucker

Anilinphthalatlösung nach B/I

e) Ketosäuren

Eine gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 96 Vol%igem Äthanol wird mit 1% Salzsäure versetzt.
Nachbehandlung: Wenige Minuten auf 70°C erhitzen.

III. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die in Chloroform gelöste Substanz wurde strichförmig auf Kieselgel H/Pyraninplatten aufgetragen (30 - 50 mg/Platte), im für Dünnschichtchromatographie beschriebenen Laufmittelsystem entwickelt und nach dem Abdunsten des Lösungsmittels im UV-Licht betrachtet. Die auf grünblauem Grunde hellblau fluoreszierenden Zonen wurden mit einer Präpariernadel markiert, ausgeschabt und 3 bis 5 Stdn. am Soxhlet mit Äther oder Chloroform extrahiert. Nach Beendigung der Extraktion wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen.

IV. Säulenchromatographie

1. Kieselgelsäulen

Verwendet wurde Kieselgel Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Zur Trennung von Glycolipid- und Zuckeracetaten wurden 100.0 g Kieselgel pro 1.0 g Acetat eingesetzt.

Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min bei 4 - 6 cm Säulendurchmessern.

Laufmittelsysteme:

a) Glykosidacetate
Benzol-Aceton (1:1)

b) Oligosaccharidacetate
Benzol-Äthylacetat (5:4)

2. Sephadexsäulen

70.0 Sephadex G_{15} wurden in 1.0 l Wasser aufgeschlämmt und bis zur vollständigen Quellung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Suspension wurde unter Vermeidung von Luftblasen in einem Guß in eine Säule von 2 cm Durchmesser gebracht. Sobald sich ein 2 cm hoher Bodensatz gebildet hatte, ließen wir langsam abtropfen. Unter hydrostatischem Druck wurde die Säule 2 Tage bei $4^{o}C$ gewaschen, wobei sich die anfängliche Abtropfgeschwindigkeit verminderte. Die Trennungen wurden mit Wasser als Elutionsmittel bei $4^{o}C$ durchgeführt.

Zur Bestimmung des Außenvolumens lösten wir eine Spatelspitze Dextranblau (Pharmacia Uppsala) in 2.0 ml Wasser, gaben es auf die Säule und eluierten mit Wasser. Wir fingen Fraktionen zu 2.0 ml auf. Der blaue Farbstoff erschien in Fraktion 14. Da das Molekulargewicht (ca. 2000) des Farbstoffes oberhalb der oberen Ausschlußgrenze, die für Sephadex G_{15} ein Mol-Gewicht von ca. 1500 ist, liegt, beträgt das Außenvolumen der Säule 28.0 ml.

V. Gaschromatographie

Modell Packard vom Typ 7500 mit einem β-Strahlen-Argon-Ionisationsdetektor und Honeywell-Kompensationsschreiber vom Typ Electronic 17. Hersteller Packard Instrument Company Inc., La Grange, Illinois, USA.
Säule:
spiralig gebogene Glassäule 2 m / 4 mm
Trägergas:
Spezial-Argon der Fa. Linde, Reinheit 99.99%
Papiervorschub: 1 inch/5 Min
Gasdurchfluß: 65 ml/Min

1. Mono- und Dicarbonsäure-Ester
   Trägermaterial: Reoplex 400, 20% auf Chromosorb WS (45 - 60 mesh)
   Säulentemperatur:
   a) kurzkettige Fettsäuremethylester: 40°C isotherm
   b) Dicarbonsäuremethylester: 50 - 190°C programmiert 2°C/Min

2. Alditolacetate der partiell methylierten Zucker
   Trägermaterial: ECNSS - M 3% (Silicon-Cyanoäthyl, Applied Science Laboratories) auf Gaschrom Q
   Säulentemperatur: 160 - 170°C isotherm

C. Physikalische Untersuchungen

Mikroanalysen

Die Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

Schmelzpunkte

Wir trockneten die Substanzen bei den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen in der Trockenpistole über Diphosphorpentoxid und bestimmten den Schmelzintervall auf der Koflerheizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

UV-Spektren

Einzelmessungen wurden im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II in 1 cm Glasküvetten durchgeführt.
Spektren wurden mit einem Beckman DB-G grating Spektrophotometer aufgenommen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckman-Spektrophotometer IR-8 in KBr oder $CHCl_3$-Lösung gemessen.

KMR-Spektren

Die Kernresonanzspektren wurden am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem Varian A-60 A Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel für 30 mg Substanz diente Deuterochloroform.

Optische Drehungen

Die Drehungen wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A_2) gemessen.

Wassergehaltsbestimmung

Etwa 100.0 mg luftrockene Substanz wurde bei möglichst hoher Temperatur im Hochvakuum getrocknet. Das trotz scharfer Trocknung nicht abgegebene Kristallwasser wurde nach Karl Fischer titrimetrisch bestimmt.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte aus einer Benzol- bzw. Pyridinlösung im Dampfdruckosmometer Mechrolab Modell 301A.

Für die Ausführung der Mikroanalysen, IR-Spektren, KMR-Spektren, optischen Drehungen, Molekulargewichtsbestimmungen und Wassergehaltsbestimmungen danke ich Herrn O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

D. Identitätsprüfung des brasilianischen Jalapenharzes durch Nachweis der Exogonsäure

I. Auf Grund der Fähigkeit zur Oximbildung:

0.1 g Harz wurden in 2.0 ml Methanol gelöst, mit 2.0 ml Bromphenolblaulösung (0.1%ig in Methanol) versetzt. In gleicher Weise wurde eine Vergleichslösung ohne Harz bereitet. Die Lösungen wurden sofort mit 0.1 N methanol.KOH bis zum deutlichen Farbumschlag nach rot versetzt. Nach etwa 5 Min Stehen bei Raumtemperatur schlug die Farbe bei brasilianischem Harz nach gelb um.

II. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Exogonsäure:

0.1 g Jalapenharz wurden mit 2.5 ml 5%iger NaOH versetzt. Innerhalb von ca. 15 Min war das Harz gelöst. Dann wurde mit 1.5 ml 25%iger Schwefelsäure angesäuert, mit Wasser auf 5.0 ml verdünnt und dreimal mit je 3.0 ml Äther ausgeschüttelt. Die getrocknete und eingeengte Ätherlösung wurde auf Kieselgel im Laufmittel Isopropanol-Ammoniak (2:1) chromatographiert und mit Vanillinschwefelsäure besprüht. Ein gelber Fleck bei R_f = 0.7, in der Literatur[15] wird für Exogonsäure ein R_f von 0.68 angegeben, zeigt die Anwesenheit von brasilianischem Jalapenharz (Ipomoea operculata) an.

E. Gewinnung der Rhamnoconvolvulinsäure

I. Isolierung von Convolvulin

100,0 g Resina Jalapae wurden in 500.0 ml Methanol gelöst und vom ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 10%iger Bleiacetatlösung im Überschuß versetzt und der gebildete Niederschlag abfiltriert. Aus der erhitzten klaren Lösung wurde der Bleiüberschuß durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt. Die bleifreie Lösung erhitzten wir mit Kohle 3 Stdn. unter Rückfluß. Nach der Entfernung der Kohle wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 200.0 ml eingeengt und die Lösung unter stetigem Umrühren in ca. 1.0 l Äther eingegossen. Es bildete sich ein brauner harziger Niederschlag. Nach Abgießen des Äthers wurde in wenig Methanol aufgenommen und erneut aus Äther umgefällt. Nach fünfmaligem Umfällen war der gebildete Niederschlag ein gelblich weißes amorphes Pulver: Convolvulin, Ausbeute: 57.0 g.

II. Alkalische Hydrolyse

1. Katalytische Hydrolyse mit Natriummethylatlösung

   10.0 Convolvulin wurden in 100,0 ml Methanol p.A. gelöst und 15,0 ml einer N-Natriummethylatlösung zugesetzt. Die Lösung blieb 12 Stdn. bei $4^{\circ}C$ und dann 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wurde mit Äther versetzt und der gebildete Niederschlag bei 8000 U/Min abzentrifugiert. Wir erhielten ein gelblich weißes Pulver von Glykosidsäuremethylestern. Ausbeute 7.4 g.

2. Natriumhydroxydhydrolyse

   7.0 Convolvulin wurden in 80.0 g 0.5 N Natriumhydroxydlösung (50% methanolisch) über Nacht stehen gelassen und dann 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Ansäuern wurde wie unter E/I mit Äther gefällt. Wir erhielten 4.0 Glykosidsäuren.

III. Acetylierung

10.0 Glykosidsäuregemisch (oder deren Methylester) wurden in 100.0 ml Pyridin gelöst, 100.0 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt, über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und abschließend 1/2 Stde. am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten gossen wir das Reaktionsgemisch unter kräftigem Umrühren in 1.0 l Eiswasser ein, rührten 1 Stde. und nutschten das Acetat ab. Ausbeute: 9.3 g. Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H mit Benzol-Aceton (1:1) fanden wir 2 Flecken bei R_f = 0.95 und R_f = 0.6.

IV. Isolierung des Rhamnoconvolvulinsäureacetats

5.0 g des Acetatgemisches wurden in Benzol-Aceton (1:1) aufgenommen und vorsichtig auf eine Kieselgelsäule aufgetragen.
Säulenhöhe: 45 cm
Säulendurchmesser: 6.0 cm
Adsorbens: Kieselgel 0.05 - 0.2 mm
Laufmittel: Benzol-Aceton (1:1)
Es wurden Fraktionen zu 50.0 ml aufgefangen, die Elution dünnschichtchromatographisch verfolgt und gleiche Fraktionen vereinigt. Ausbeute: 2.3 Acetat I; (R_f 0.95; Benzol-Aceton (1:1).

Rhamnoconvolvulinsäureoctadecaacetat
Schmp. : 94° - 96°C $[\alpha]_D^{24°}$ = -30.6° (c = 0.9598 in Chloroform.)

$C_{88}H_{128}O_{50}$ (1985.94) Ber. C 53.18 H 7.02
Gef. C 53.3 H 6.7

18 CH_3CO Ber. 38.54
Gef. 36.66

IR (in KBr): CO 1720 cm^{-1}

V. Entacetylierung von Acetat I

1. Gewinnung des Rhamnoconvolvulinsäuremethylesters

2.0 g Acetat wurden in 20.0 ml Methanol p.A. gelöst, 1.0 ml N-Natriummethylatlösung zugesetzt und wie unter E/II beschrieben behandelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Rückstand (1.6 g) in 4.0 ml Wasser aufgenommen, ca. 100.0 mg Natriumchlorid zugesetzt und zur Reinigung über die Sephadex G_{15}-Säule gegeben. Wir vereinigten die durch das Außenvolumen und die erste Chlorid positive Fraktion begrenzten Fraktionen 14 mit 19 und lyophylisierten die Lösung.

Wir erhielten 1.2 g Rhamnoconvolvulinsäuremethylester, den noch 3.82% Wasser enthielt, das auch bei scharfem Trocknen über Phosphorpentoxid nicht entfernt werden konnte.
Rhamnoconvolvulinsäuremethylester · $3H_2O$.
Schmelzber.: 142° - 145°C unter Blasenbildung $[\alpha]_D^{24^\circ}$ = -33.2° (c = 1.1133 in Wasser).

$C_{53}H_{94}O_{32}$ (1243.3) · 3 H_2O

Ber.	C 49.9	H 7.3	H_2O 4.1
Gef.	C 49.6	H 6.8	H_2O 3.82

IR (in KBr): CO 1720 cm^{-1} OH 3200 - 3500 cm^{-1}

2. Gewinnung der Rhamnoconvolvulinsäure

Wie unter E/II/2 beschrieben, mit anschließender Reinigung über Sephadex G_{15} nach E/V/1.

Rhamnoconvolvulinsäure
Schmelzber.: 182° - 185° (unter Blasenbildung) $[\alpha]_D^{24^\circ}$ = -48.6 (c = 1.17 in Pyridin)

$C_{52}H_{92}O_{32}$ (1229.3) Ber. C 50.8 H 7.5
Gef. C 50.6 H 7.4

IR(in KBr): CO 1700 cm^{-1} OH 3200 - 3500 cm^{-1}

F. Chemische Untersuchungen der Rhamnoconvolvulinsäure

I. Hydrolysen

1. Hydrolyse der Rhamnoconvolvulinsäure

2 - 10 mg Substanz wurden mit 0.2 - 1.0 ml 3N H_2SO_4 oder HCl in einer zugeschmolzenen Glasampulle 3 Stdn. bei 100°C oder 12 Stdn. mit N-H_2SO_4 (HCl) bei 100°C hydrolysiert. Nach dem Erkalten wurde 3mal mit 2.0 ml Chloroform ausgeschüttelt und die wässrige Phase mit Dowex 2 (HCO_3^--Form) auf pH 6 - 7 neutralisiert. Die überstehende Lösung wurde nach B/Ia auf Zucker chromatorgraphiert.

2. Hydrolyse des Acetats

2 - 10.0 mg Acetat wurden mit 0.2 - 1.0 ml methanolischer 3N H_2SO_4 wie unter F/I/1 beschrieben in einer Glasampulle hydrolysiert. Zur Isolierung der Säuremethylester wurde mit Wasser verdünnt und 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus der verbleibenden wässrig-methanolischen Phase wurde das Methanol im Vakuum entfernt und erneut 1 Stde. hydrolysiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach F/I/1.

II. Darstellung der Zuckerosazone

1. Hydrolyse

Zur Darstellung der Osazone wurde von 100.0 mg Glykosid ausgegangen, mit 3N H_2SO_4 3 Stdn. unter Rückfluß hydrolysiert, mit $BaCO_3$ neutralisiert, der Niederschlag abzentrifugiert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt.

2. Darstellung der Zuckerosazone

Das nach F/II/1 erhaltene Zuckergemisch wurde mit einer Lösung von 100.0 mg frisch umkristallisiertem Phenylhydrazinhydrochlorid und 150.0 mg Natriumacetat in 2.0 ml Wasser versetzt. In einem Schliffkolben mit aufgesetztem

Kühler wurde die Lösung 1 Stde. am siedenden Wasserbad erhitzt. Das nach dem Erkalten ausgefallene Mischosazon saugten wir ab und digerierten mit 2.0 ml Aceton. Dabei löste sich das Rhamnoseosazon. Wir kristallisierten aus 30%igem Äthanol um. Rhamnoseosazon Schmp.: 178 - 180°C; Glucoseosazon: 205 - 207°C.

III. Darstellung der Fettsäuremethylester

Die Chloroformlösung nach F/I/1, die die Fettsäuren enthielt, wurde 3mal mit wenig Wasser gewaschen, zur Trockene eingeengt und in Äther aufgenommen. Wir methylierten nach der Methode von POHL, GLASL u. WAGNER[36], indem wir aus 1.5 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluylsulfonamid (MNSA) in 3.0 ml Äther, 3.0 ml 60%iger KOH und 5.0 ml Carbitol (Glykol-Monoäthyläther) Diazomethan herstellten und dieses mit Hilfe von Stickstoff in die in Äther gelösten Fettsäuren einleiteten. Nach Beendigung der Methylierung, sichtbar an der durch überschüssiges Diazomethan verursachten Gelbfärbung, wurde die Ätherlösung zur Trockene eingeengt und der Rückstand in Chloroform p.A. aufgenommen und nach B/II/2/c dünnschichtchromatographisch untersucht.

Zur präparativen Darstellung des Methylesters hydrolysierten wir 400.0 mg Acetat I 5 Stdn. in 3N methanolischer Schwefelsäure, verdünnten mit Wasser und schüttelten nach dem Erkalten 3mal mit Chloroform p.A. aus. Wir methylierten wie oben beschrieben nach und reinigten den 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylester über 5 Kieselgel H/Pyranin-Platten nach B/II/1. Ausbeute: 28.0 mg. 3,12-Di-hydroxy-palmitinsäuremethylester Schmp. 80° - 81°C.

$C_{17}H_{34}O_4$	Ber. C 67.53	H 11.3
	Gef. C 67.4	H 10.6

IR (in KBr): CO 1740 cm^{-1} OH 3340 u. 3420 cm^{-1} (siehe Abb. 7, S. 27).

KMR ($CDCl_3$ TMS int.) (siehe Abb. 6, S. 24): ω-$CH_3\delta$= 0.88 (3 H, J = 5.0 cps); $CH_2\delta$= 1.35 (25 H); OHδ= 2.14 (2 H, s); α-$CH_2\delta$= 2.45 (2 H, m); $OCH_{12}H\delta$= 3.6 (1 H, br); OC_β Hδ= 4.0 (1 H, br); $OCH_3\delta$= 3.68 (3 H, s).

IV. Quantitative Bestimmung der Zucker

1. Anthron-Methode

2 - 6 mg Glykosidsäure werden mit der 100fachen Menge 3N wässriger Schwefelsäure in einer Glasampulle 3 Stdn. bei 100°C hydrolysiert. Die Hydrolysenlösung wird mit 5.0 ml Chloroform ausgeschüttelt, filtriert und auf 10.0 ml ergänzt.

2.0 ml des gekühlten Hydrolysats werden mit NaOH auf pH 4 - 7 gebracht, tropfenweise mit Ammoniumreineckatlösung bis zur leichten Rosafärbung der Lösung versetzt und auf 5.0 ml mit Wasser ergänzt.

2.0 des gekühlten Filtrats werden mit 5.0 ml 0.2%iger Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure versetzt und 4 Min im siedenden Wasserbad erhitzt.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird bei 620 mμ im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II gegen eine Blindlösung gemessen (siehe Tabelle 8, S. 77).

Die Eichkurve stellten wir mit Glucose (Merck Nr.: 8337) auf.

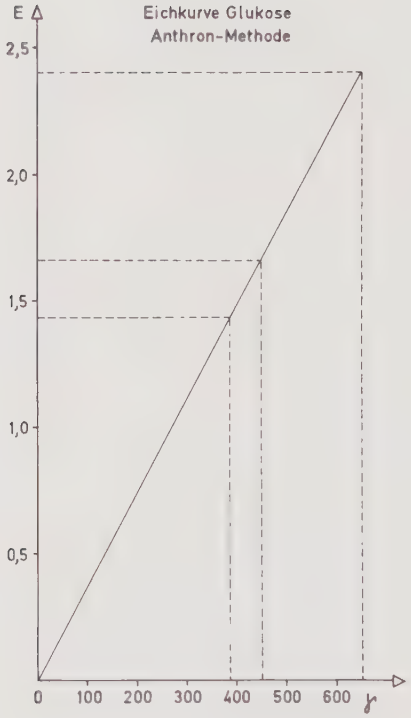


Abb. 21

Eichkurve von Glucose nach der Anthron-Methode

----- gefundene Werte

T a b e l l e 8

Zuckerbestimmung nach der Anthron-Methode nach verschiedenen Hydrolysendauern (auf Glucose bezogen)

Glucose mg	Glykosid mg	Hydrolysendauer Stdn.	Extinktion E 620 mμ	Glucose mg	Glucose %
21			0.08		
42			0.165		
105			0.45		
210			0.78		
	1.7	3	2.40	0.64	37.8
	0.96	5	1.42	0.38	39.55
	1.16	8	1.67	0.45	39.7

2. Cysteinbestimmung

Die Differenzierung nach einzelnen Klassen, nämlich Hexosen und Methylpentosen nahmen wir nach einer Methoden von DISCHE vor. Zu der Glykosidlösung, die bei der Rhamnosebestimmung 10 - 60 γ und bei der Glucosebestimmung 15 - 200 γ enthielt, (siehe Tabelle 9 u. 10, S. 80), die auf je 1.0 ml Wasser ergänzt wurde, setzten wir unter Eiskühlung 4.5 ml einer Mischung von 6 Teilen konz. H_2SO_4 und 1 Teil Wasser zu. Nach 1 Min wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser geschüttelt, dann in Leitungswasser gestellt und zuletzt 3 Min bei Hexosen und 10 Min bei Methylpentosen im siedenden Wasserbad erhitzt.

Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches in Leitungswasser wurde 0.1 ml einer 3%igen Cysteinhydrochloridlösung zugesetzt und die Mischung kräftig geschüttelt.

Im Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II wurde gegen die entsprechende Blindlösung bei Hexosen bei 414 und 380 mμ, bei Methylpentosen bei 396 und 427 mμ gemessen.

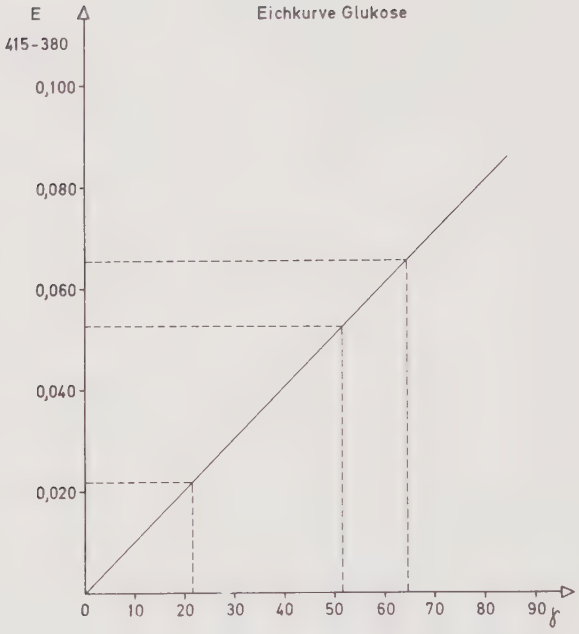


Abb. 22

Eichkurve von Glucose nach der Cystein-Methode aus der Differenz E_{Δ} (414 - 380 mμ)

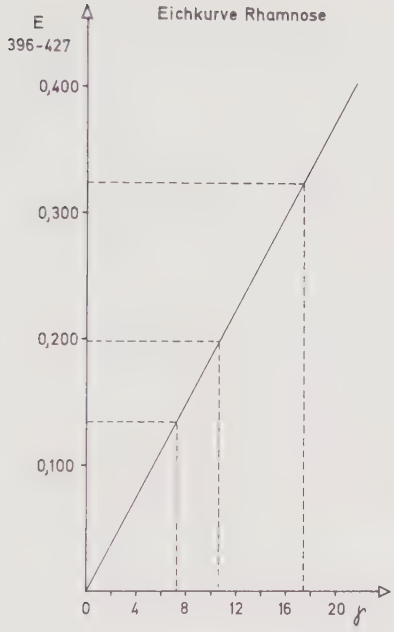


Abb. 23

Eichkurve von Rhamnose nach der Cystein - Methode
Differenz $E_{\triangle}$ (396 - 427 mμ)

T a b e l l e 8

Glucosewerte der Bestimmung mit Cystein

Glucose γ	Rhamnose γ	Glykosid γ	$E_{414}^{m\mu}$	$E_{380}^{m\mu}$	$E_{414}-E_{380}$	Glucose γ	gef. %
16.9	6.9		0.085	0.064	0.021		
33.8	13.4		0.187	0.152	0.035		
50.7	20.1		0.272	0.217	0.055		
67.7	26.8		0.332	0.267	0.065		
84.5	33.5		0.455	0.386	0.087		
		16.2	0.052	0.037	0.011	10.1	62.5
		32.4	0.112	0.090	0.022	21.5	66.5
		81.0	0.295	0.240	0.055	53.0	65.5
		113.4	0.432	0.359	0.073	70.5	62.5
		162.0	0.625	0.516	0.109	110.0	62.5
					Mittelwert:		63.4%

T a b e l l e 10

Rhamnosewerte der Bestimmung mit Cystein (10 Min erhitzt)

Glucose γ	Rhamnose γ	Glykosid γ	$E_{396}^{m\mu}$	$E_{427}^{m\mu}$	$E_{396}-E_{427}$	Rhamnose γ	Rhamnose %
127.0	-	-	0.178	0.180	-	-	-
50.8			0.102	0.102			
50.8	5.0		0.172	0.080	0.092		
	5.0		0.060	0.030	0.090		
	10.0		0.171	0.007	0.178		
	20.0		0.405	0.030	0.375		
	15.0		0.320	0.021	0.280		
		11.8	0.075	0.010	0.065	3.5	29.7
		23.6	0.142	0.010	0.132	7.2	30.5
		35.4	0.240	0.042	0.198	10.6	29.9
		59.0	0.408	0.084	0.324	17.4	29.5
					Mittelwert:		29.9%

V. Quantitative Bestimmung der Fettsäure

Die nach F/I/2 erhaltene Chloroformlösung, die die Fettsäuremethylester enthielt, wurde über Phosphorpentoxid und Paraffinspänen im Vakuumexsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Fettsäuremethylestergehalt gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 11

Fettsäuremethylesterbestimmung aus Acetat I

Einwaage Acetat I	Auswaage Fettsäuremethylester	
mg	mg	%
169.3	26.45	15.62
194.3	29.1	14.98
183.5	28.07	15.30

Mittelwert: 15.3%

Theoretisch: 15.04%

G. I. Permethylierung

Die nach E/IV erhaltene und über Phosphorpentoxid getrocknete Rhamnoconvolvulinsäure wurde nach HAKOMORI[56] permethyliert. Auf 100,0 mg Natriumhydrid, die sich in einem Jodzahlkolben befanden, wurden im Vakuum unter schwachem Stickstoffstrom 30,0 ml über Calciumhydrid getrocknetes DMSO destilliert. Anschließend wurde der Jodzahlkolben sofort mit einem Calciumchloridrohr verschlossen und die Suspension 1 Stde. bei 80°C gerührt. In gleicher Weise wurden auf 100,0 mg Glykosid gerade soviel DMSO destilliert, als zur vollständigen Lösung nötig war, die Lösung in einem Exsiccator über Calciumchlorid zum Feuchtigkeitsausschluß nach einer Stunde zu obiger Suspension gegeben und erneut 1 Stde. bei 80°C gerührt.

Nach dem Abkühlen wurde im Eisbad unter Lichtabschluß 5,0 ml frisch destilliertes Methyljodid unter Rühren zugesetzt und 12 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Der Kolben blieb mit einem Calciumchloridrohr verschlossen, um sowohl Feuchtigkeit auszuschließen, als auch Überdruck entweichen zu lassen, da auf Grund der exothermen Reaktion Überdruck entsteht. Die jetzt dünnflüssige Lösung wurde auf 200,0 ml Eiswasser gegossen und 5mal mit je 50,0 ml Chloroform p.A. ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden mit 50,0 ml 2%iger $Na_2S_2O_3$-Lösung und 3mal mit wenig Wasser gewaschen.
Die mit Na_2SO_4 sicc. getrocknete Chloroformlösung engten wir im Vakuum bei 40°C zum Sirup ein, nahmen in 30,0 ml Äther-Petroläther (2:1) auf, wuschen mit Wasser, trockneten erneut mit Na_2SO_4 sicc. und engten unter Stickstoff zur Trockene ein.

Das erhaltene harzförmige Permethylierungsprodukt, ca. 90.0 mg, wurde in 2.0 ml Chloroform aufgenommen und auf 4 nach B/II/1 hergestellten Kieselgel H/Pyraninplatten aufgetragen. Die bei R_f = 0,69 auf grünblauem Untergrund hellblau fluoreszierende Zone wurde unter dem UV-Licht mit einer Präpariernadel markiert und ausgeschabt.

Nach 3stündiger Extraktion am Soxhlet mit Chloroform erhielten wir nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff 70 mg gereinigten Permethyläther, der der Hydrolyse unterworfen wurde.

II. Hydrolyse

1. Methanolische Hydrolyse

70.0 mg des gereinigten Permethyläthers wurden in 10.0 ml 5%iger methanolischer Salzsäure 5 Stdn. am Rückflußkühler hydrolysiert. Nach dem Entfernen des Methanols wurde mit N-Salzsäure versetzt und erneut 2 Stdn. unter Rückfluß hydrolysiert.

Zur erkalteten Lösung gaben wir spatelweise Dowex 2 (HCO_3^--Form) und mischten am Wirlimix kräftig durch. Dies wurde bis zur neutralen Reaktion der Lösung fortgesetzt. Nach dem Abfiltrieren des Ionenaustauschers wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingeengt. Wir erhielten ca. 45 mg Methylzucker, die wir sowohl direkt papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch untersuchten, als auch zur Gaschromatographie in ihre Alditolacetate überführten.

Wir fanden papierchromatographisch im System n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4 Oberphase) 4 Flecken (R_{TG} 1,0; 0.90; 0.68 und 0.62) (siehe Tabelle 3, S. 43) und dünnschichtchromatographisch im System Benzol-Äthanol (8:2) 4 Flecken (R_{TG} 1.08; 1.00; 0.80 und 0.43) (siehe Abb. 15, S. 44).

2. Hydrolyse mit Kiliani-Mixtur

20.0 des Permethyläthers lösten wir in 10.0 ml Kiliani-Mixtur (35.0 ml Eisessig, 55.0 ml Wasser und 10.0 ml Salzsäure (37%ig)) und hydrolysierten 5 Stdn. unter Rückfluß. Nach Verdünnen mit Wasser und Entfernung der Hauptmenge Essigsäure am Rotationsverdampfer bei 40°C wurde,

wie oben beschrieben, durch Zugabe von Dowex 2 (HCO_3^--Form) neutralisiert und zur Trockene eingeengt.
Wir fanden chromatographisch die gleichen Methylzucker, wie bei der unter G/II/1 beschriebenen methanolischen Hydrolyse.

III. Darstellung der Methylzuckeralditolacetate

1. Reduktion mit Natriumborhydrid
Ein aliquoter Teil der nach G/II erhaltenen partiell methylierten Zucker (1.0 mg) wurde in Wasser (5.0 ml) mit Natriumborhydrid (10.0 mg) im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stdn. stehen gelassen. Dann wurden durch spatelweise Zugabe von frisch regeneriertem Dowex 50 (H^+-Form) und kräftigem Mischen am Wirlimix die Na^+-Ionen entfernt. Anschließend filtrierten wir in ein Schliffkölbchen, wuschen 2mal mit 2.0 ml Wasser nach und engten am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene ein.

2. Entfernung der Borsäure
Die Proben wurden mit je 3.0 ml Methanol versetzt und der gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Diesen Vorgang wiederholten wir 4mal, um die Borsäure quantitativ zu entfernen, da Reste von Borsäure die nachfolgende Acetylierung stören würden.

3. Acetylierung
Wir pipettierten in die Schliffkölbchen 2.0 ml einer Mischung von Pyridin p.A. und Essigsäureanhydrid p.A.. Die Schliffstopfen wurden mit PVC-Folien fixiert und die Kölbchen 15 Min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 5.0 ml Wasser verdünnt und im Vakuum zur Trockene eingeengt, bis der Rückstand nicht mehr nach Pyridin oder Essigsäure roch.

Der am Schliffkolben als harziger Belag sichtbare Rückstand wurde in 0.2 ml Chloroform p.A. aufgenommen und nach B/V/2 gaschromatographisch untersucht.

Einspritzmenge: 4 µl
Wir fanden 4 Peaks vom R_{TG} 0.43; 1.0; 4.05 und 5.4)
(siehe Abb. 17, S. 48 und Tabelle 4, S. 47).

H. Acetolyse

I. Darstellung der Oligosaccharidacetate

Jeweils 1.0 g Rhamnoconvolvulinsäure oder ihr Acetat wurden in 16.0 ml Essigsäureanhydrid gelöst und unter stetigem Umrühren und Eiskühlung 0.5 ml H_2SO_4 konz. tropfenweise zugesetzt. Anschließend rührten wir eine 1/2 Stde. bei Eiskühlung und 12 Stdn. bei Raumtemperatur.

Das grün gefärbte Reaktionsprodukt wurde auf 200.0 ml Eiswasser gegossen und 5mal mit 100.0 ml Chloroform ausgeschüttelt. Dabei eventuell gebildete Emulsionen wurden durch Abnutschen über Celite gebrochen. Die vereinigten organischen Phasen wuschen wir 1mal mit 100.0 gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und 3mal mit 100.0 Wasser. Die mit Na_2SO_4 sicc. getrocknete Chloroform-Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt.
Ausbeute: ca. 300.0 mg.
Von dem entstandenen Gemisch von α-Acetaten wurde ein Teil entacetyliert, ein anderer Teil über Kieselgel-Säulen getrennt.

II. Trennung der Oligosaccharidacetate

Die Trennung der gebildeten α-Acetate erfolgte über eine Kieselgelsäule. In eine Säule von 2.5 cm Durchmesser und 30.0 cm Länge wurden ca. 50.0 Kieselgel Merck 0.05 - 0.2 mm mit Benzol-Äthylacetat (5:4) eingeschlämmt. Nach dem Absitzen wurde die Kieselgelschicht durch eine Filtrierpapierscheibe abgedeckt. 300.0 mg des Acetolyseproduktes wurden in 5.0 ml Benzol-Äthylacetat (5:4) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Wir eluierten mit Benzol-Äthylacetat (5:4) und fingen Fraktionen zu 10.0 ml auf.

Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel H im Laufmittel Benzol-Äthylacetat (5:4) untersucht (Sprühmittel: 50%ige äthanolische Schwefelsäure) und gleiche Fraktionen vereinigt. Wir fanden 6 Flecken (siehe Abb. 18, S. 54). Davon konnten wir das Acetat E und das Acetat D rein isolieren.
Acetat E (ca. 30.0 mg) Schmp.: 78° - 79°C, opt. Drehung $[\alpha]_D$ = +20.1 ($CHCl_3$; c = 1.4; 22°C)
Acetat D (ca. 10.0 mg) Schmp.: 60°C.

III. Darstellung der freien Oligosaccharide

100.0 mg nach H/I erhaltenes Oligosaccharidacetatgemisch wurden in 10.0 Methanol p.A. gelöst und 0.1 ml N-Natriummethylatlösung zugesetzt. Nach Stehen über Nacht bei 4°C wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Äther gefällt.

Der abzentrifugierte Niederschlag enthielt die freien Zucker, die wir papierchromatographisch nach B/I untersuchten. Wir fanden im Laufmittel A neben Glucose und Rahmnose 4 Zuckerflecken mit dem R_G 1.16; 0.71; 0.61 und 0.44 (siehe Abb. 19, S. 55).

Bei analoger Entacetylierung des isolierten Zuckeracetats D bzw. E fanden wir im Laufmittel A den Zuckerfleck I (R_G = 1.16) bzw. den Zuckerfleck II (R_G = 0.71).

IV. Anreicherung der Disaccharide

Die nach H/III aus dem Acetolyseprodukt erhaltenen freien Zucker (ca. 100.0 mg) wurden in 2.0 ml Wasser aufgenommen und auf der unter B/IV/b beschriebenen Sephadex-Säule chromatographiert. Es wurden Fraktionen zu 2.0 ml aufgefangen und papierchromatographisch nach B/I untersucht. In den Fraktionen 18 bis 20 fanden wir das Tri- und Tetrasaccharid (Zucker III und IV), in den Fraktionen 21 mit 23 ein Gemisch aus dem Trisaccharid und den Disacchariden und in den Fraktionen 24 bis 26 Disaccharide, Glucose und Rhamnose.

Die Fraktionen 20 mit 26 wurden am Rotationsverdampfer auf 2,0 ml eingeengt und erneut über die Sephadex-Säule getrennt. Wir erhielten jetzt die Fraktionen 23 bis 26 als annähernd reine Disaccharidfraktionen.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung nach B/I/1/a fanden wir im Laufmittel A neben dem Disaccharid I (R_G = 1,16) und Laminaribiose (R_G = 0,71) in Spuren einen Zuckerfleck bei R_G 0,43, der in den Laufmitteln C und F identisch mit Maltose (R_M = 1, Bezugssubstanz Maltose) lief, und einen Zuckerfleck bei R_G = 0.77, der sich im Laufmittel D (R_G = 1.05) und im Laufmittel B (R_G = 0.65) identisch mit Rutinose verhielt.

I. Chromatoxidation des Glykosidsäuremethylesters

200.0 mg Rhamnoconvolvulinsäuremethylester wurden in 20,0 ml einer Mischung aus Aceton und Wasser 1:1 gelöst. Wir gaben eine Lösung von 1.6 g CrO_3 und 1.6 ml H_2SO_4 konz. in 100,0 ml Wasser dazu und rührten über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 100.0 ml Methanol p.A. wurde bis zur Grünfärbung gerührt. Wir setzten 20.0 ml H_2SO_4 konz. zu und hydrolysierten 5 Stdn. unter Rückfluß. Nach dem Erkalten wurde mit 200.0 ml Wasser verdünnt und 5mal mit je 100,0 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroform-Phasen wurden mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und 3mal mit 100,0 ml Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet und bei 40°C im Vakuum eingeengt.

Der Rückstand wurde in Äther aufgenommen und wie unter F/III beschrieben nachmethyliert.
Der Methylester wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Hierzu wurde das nachmethylierte Rohprodukt (ca. 15,0 mg) auf 3 Kieselgel H/Pyranin-Platten nach B/II/1 aufgetragen und im Laufmittel Äther-Petroläther 3:7 entwickelt.
Eine bei R_f = 0.45 hellblau fluoreszierende Zone wurde ausgeschabt und am Soxhlet mit Chloroform p.A. 3 Stdn. extrahiert. Ausbeute ca. 9,0 mg.

IR (in KBr): OH 3450 cm^{-1} Ester-CO 1745 cm^{-1} Keto-CO 1730 cm^{-1} β-OH- α,β-ungesättigte Ester-CO 1650 cm^{-1} (siehe Abb. 13, S.37).

KMR ($CDCl_3$) TMS int.): ωCH_3 δ = 0.92 (t, J = 5 cps); CH_2 δ = 1.34 (s); αCH_2 δ = 3.73 (br); $OC_{12}H$ δ = 3.4 - 3.8 (br); OCH_3 δ = 3.69 (s); $C_{12}OH$ δ = 2.0 - 2.5 (br); γCH_2 δ = 2.32 (t, J = 7 cps)

Tabelle 12

(Bisher aus Convolvulaceen isolierte Glykoresine und ihre Bausteine)

Stammpflanze	Glykoresin	Alkal. Hydrolyse d. Glykoresins		Saure Hydrolyse der Glykosidsäure	
		Säuren	Glykosidsäure	OH-Fettsäure	Zucker
Ipomoea purga	Convolvulin 13)14)15)16)	Methyläthyl-essigs. 13)14)15) Valeriansäure 13)14)15) iso-Valerians. Essigsäure 13)14)15) Exogonsäure 13) Tiglinsäure 14)15) Propions. 14)15) iso-Butters. 14)15)	Rhamnoconvolvulins. 13)7) Convolvulins. 14)15)	Convulvinols. 13)14)15) 3,12-Di-OH-palmitins. 7) Ipurols. 14)15) (=3,11-Di-OH-myristins.)	Glucose 13)14)15)7) Rhamnose 13)14)15)7) Fucose 14)15)
			Purgins. 14)15)	Hydroxylaurins. 14)15) Ipurols. 14)	Rhamnose 14)15)
	Jalapin 13)14)	Methyläthyl-essigs. 13)14)15) n-Valerians. 13)14)15) iso-Valerians. 13)14)15) Tiglins. 13)14)15) Propions. 14)15) iso-Butters. 14)15) Essigs. 14)15)	Jalapins. 13) Oligosaccharids. 15)	Jalapinols. 13)14) (=11-OH-palmitins.)	Glucose 13)14)15) Rhamnose 13)14)15) Fucose 14)15)

Fortsetzung:

Ipomoea operculata	Convolvulin	Tiglins.14)15) Essigs.14)15) Trimethylessigs.14)15) n-Valerians.14)15) Methyläthylessigs.15) iso-Valerians.15) Exogons.15) 4-Oxo-capryls.15)	Oligosaccharids.	Operculinols.14)15) (=3,12-Di-OH-palmitins.) Brasiliols.14)15) (=Trioxymyristins.)	Glucose 14)15) Rhamnose 14)15)
	Jalapin 15)	Methyläthylessigs.15) iso-Valerians.15) Propions.15) Essigs.15) Tiglins.15) n-Valerians.15) Trimethylessigs.15)		Jalapinols.15)	Glucose 15) Rhamnose 15)
	Kein Unterschied zu Ipomoea purga 13)				

Stammpflanze	Glykoresin	Alkal. Hydrolyse d. Glykoresins		Saure Hydrolyse d. Glykosidsäure	
		Säuren	Glykosidsäure	OH-Fettsäure	Zucker
Ipomoea orizabensis (=Convolvulus scammonia)	α-Scammonin 13)	n-Valerians. 13) iso-Valerians. 13)		α-Scammonols. 13)	Glucose 13)
	Scammonin 13)	n-Valerians. 13) iso-Valerians. 13) Methyläthyl-essigs. 13) Tiglins. 13)		Scammonols. 13)	Glucose 13) Rhamnose 13) Rhodeose 13)
		Tiglins. 14) Essigs. 14) Propions. 14) iso-Butters. 14) iso-Valerians. 14) Methyläthylessigs. 14) n-Valerians. 14)	Convolvulins. 14)	Ipurols. 14) Convulvinols. 14)	Glucose 14) Rhamnose 14) Fucose 14)
				Jalapinols. 14)	Glucose 14) Rhamnose 14) Fucose 14)
Ipomoea simulans: gleiche Inhaltsstoffe wie Ipomoea orizabensis mit Ausnahme der n-Valerians[14].					
Ipomoea fistulosa	Hochmolekulares Estergly-kosid 23)	Tiglins. 23) Essigs. 23) Butters. 23) iso-Butters. 23) n-Valerians. 23) iso-Valerians. 23) 3,11-Di-OH-tetra-decans. 23)	Glykosids. gemisch 23)	7-OH-Decans. 23) 11-OH-Tetradecans. 23) 11-OH-Hexadecans. 23) 3,11-Di-OH-tetra-decans. 23)	Glucose 23) Rhamnose 23) Fucose 23) Quinovose 23)

Fortsetzung:

Ipomoea turpethum	Turpethin	Methyläthylessigs.13) Valerians.13)	Turpethins.13)	Turpethols.13)	Glucose 13) Rhamnose 13)
	α-Turpethin	Methyläthylessigs.13) Valerians.13) Tiglins.13)		α-Turpethols.13)	Glucose 13) Rhamnose 13)
	β-Turpethin 13)	Valerians.13)		β-Turpethols.13)	Glucose 13) Rhamnose 13)
Ipomoea parasitica		α-Methylbuttersäure 80)		11-OH-Hexadecans. 80)	Fucose 80) D-Quinovose 80) 6-Deoxygulose 80)
Ipomoea muricata	Muricatin A 16)	Palmitins.16) Stearins.16) Capryls.16)	Muricatin B 16)	11-OH-Hexadecans.16)	Rhamnose 16)
Pharbitis Nil		Valerians.17) α-Methylbutters. 17) Tiglins.17) β-Methyl-β-OH-butters.17)	Pharbitinsäuren 17) A, B, C u. D	Ipurols.17)	Glucose 17) Rhamnose 17)

Von den aufgeführten Glykosidsäuren ist nur bei Muricatin B und der Pharbitinsäure die Struktur bekannt.

Ähnliche Glykoresine wurden in folgenden Vertretern der Familie der Convolvulaceen gefunden:

Calystegia sepium L. (= Convolvulus sepia L. [81)82)]

Convolvulus arvensis L.[12)]
elongatus WILLD[12)]
hirsutus M.B.[12)]
pentapetaloides L.[12)]
scammonia L.[12)]
tricolor L.[12)]
undulatus CAV.[12)]

Ipomoea sibirica JACQ.[12)]

Pharbitis hederacea CHOISY[12)]
hispida CHOISY[12)]
nivalis G.DON.[12)]
purpurea L.[12)]

Quamoclit coccinea MOENCH[12)]
hederifolia G.DON[12)]

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) A.TSCHIRCH u. E.STOCK, Die Harze, Bd.II, 2.Hälfte, 2.Teil, S. 1618 (Bornträger Berlin 1936)
2) CADET de GASSICOURT, J.pharm. [2] 3, 495 (1817)
3) KAYSER, Ann.Chem.Pharm. 51, 81 (1844)
4) N.KROMER, Arch.Pharm. 239, 373, 384 u. 389 (1901)
5) TAVERNE, Rev.trav.Chim. 13, 187 (1894)
6) HOEHNEL, Arch.Pharm. 234, 647 (1896)
7) E.VOTOCEK u. F.VALENTIN, Collect.Trav.Chim.Tchecoslovaquie 1, 47 (1929)
8) E.VOTOCEK u. V.PRELOG, Collect.Trav.Chim.Tchecoslovaquie 1, 55 (1929)
9) C.MANNICH u. P.SCHUMANN, Arch.Pharm. 276/48, 211 (1938)
10) K.H.BAUER u. R.JUNGE, Arch.Pharm. 271/44, 841 (1934)
11) Y.ASAHINA u. J.YAOI, J.Pharm.Soc.Japan 523, 779 (1925)
12) R.JARETZKY u. E.RISSE, Arch.Pharm. 278, 241 u. 379 (1940)
13) H.AUTERHOFF u. H.DEMLEITNER, Arzneimittel-Forsch. 5, 402 (1955)
14) E.J.SHELLARD, Planta med. 9, 102, 141 u. 146 (1961)
15) E.GRAF, E.DAHLKE u. H.W.VOIGTLÄNDER, Arch.Pharm. 298, 81 (1965)
16) S.N.KHANNA u. P.C.GUPTA, Phytochemistry 6, 753 (1967)
17) H.OKABE u. T.KAWASAKI, Tetrahedron L. 3123 (1970)
18) Y.ASAHINA u. S.TERADA, Yakugaku Zasshi 39, 821 (1919)
19) A.P.TULLOCH, A.HILL u. J.F.T.SPENCER, Can.J.Chem. 46, 3337 (1968)
20) A.P.TULLOCH, J.F.T.SPENCER u. M.H.DEINEMANN, Can.J.Chem. 46, 345 (1968)
21) W.PEYER u. K.ROSENTHAL, Apoth.Ztg. 44, 1329 (1929)
22) A.L.MISRA u. J.D.TEWARI, J.Indian.chem.Soc. 29, 63 (1952)
23) G.LEGLER, Phytochemistry 4, 29 (1965)
24) L.P.KUHN, Analytic.Chem. 22, 276 (1950)
25) P.FLODIN, J.Chromatogr. 5, 103 (1961)
26) H.WAGNER, L.HÖRHAMMER u. P.WOLFF, Biochem.Z. 334, 175 (1961)
27) F.G.FISCHER u. H.DÖRFEL, Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 297, 164 (1954)
28) G.GUINN, J.Chromatogr. 30, 178 (1967)
29) S.MALLOV, J.McKIBBIN u. J.S.ROBB, J.biol.Chemistry 201, 825 (1953)
30) Z.DISCHE in D.GLICK (Editor)Methods of Biochemical Analysis, Vol.II, Interscience Publishers, New York S.323 (1955)
31) F.BANDOW, Biochem.Z. 294, 124 (1937)
32) G.HOLZMANN, R.V.McALLISTER u. C.NIEMANN, J.biol.Chemistry 171, 27 (1947)
33) Z.DISCHE, J.biol.Chemistry 181, 379 (1949)
34) M.W.ROOMI, M.R.SUBBARAM u. K.T.ACHAYA, J.Chromatogr. 24, 93 (1966)
35) K.REHM, Dissertation München 1967
36) C.Y.HOPKINS u. H.J.BERNSTEIN, Can.J.Chem. 37, 775 (1959)
37) I.KITAGAWA, M.SUGAI u. F.A.KUMMEROW, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 39, 217 (1962)
38) R.T.O'CONNOR, C.H.MACK, E.F.DUPRE u. W.G.BICKFORD, J.org. Chemistry 18, 693 (1953)

39) R.RYHAGE u. E.STENHAGEN, Ark.Kemi 15, 545 (1960)
40) R.RYHAGE u. E.STENHAGEN, J.Lipid Research 1, 361 (1960)
41) G.P.HAPP u. D.W.STEWART, J.Amer.chem.Soc. 74, 4404 (1952)
42) F.W.McLAFFERTY, Anal.Chem. 28, 306 (1956)
43) NG.DIN-NGUYEN, R.RYHAGE, S.STÄLLBERG-STENHAGEN u. E.STENHAGEN, ASTM E-14 Meeting on Mass Spectrometry, Atlantic City N.J. June 1960
44) M.MATIC, Biochem.J. 63, 168 (1956)
45) G.D.MEAKINS u. R.SWINDLESS, J.chem.Soc.(London) 1044 (1959)
46) P.POHL, H.GLASL u. H.WAGNER, J.Chromatogr. 42, 75 (1969)
47) G.I.POOS, G.E.ARTH, R.E.BEYLER u. L.H.SARRET, J.Amer.chem. Soc. 75, 422 (1953)
48) R.H.CORNFORTH, J.W.CORNFORTH u. G.POPJAK, Tetrahedron 18, 1351 (1962)
49) W.S.DENHAM u. H.WOODHOUSE, J.chem.Soc.(London) 103, 1735 (1913)
50) W.N.HAWORTH, J.chem.Soc.(London) 107, 8 (1915)
51) T.PRURDIE u. J.C.IRVINE, J.chem.Soc.(London) 83, 1021 (1903)
52) R.KUHN, H.TRSICHMANN u. I.LÖW, Angew.Chem. 67, 32 (1955)
53) K.WALLENFELS, G.BECHTLER, R.KUHN, H.TRISCHMANN u. H.EGGE, Angew.Chem. 75, 1014 (1963)
54) H.C.SRIVASTAVA, P.P.SINGH, S.N.HARSHE u. K.VIRK, Tetrahedron L. 493 (1964)
55) G.AURNHAMMER, Dissertation München (1968)
56) S.HAKOMORI, J.Biochemistry (Tokyo) 55, 205 (1964)
57) E.J.COREY u. M.J.CHAYKOVSKY, J.Amer.chem.Soc. 84, 866 (1962)
58) K.SJÖBERG, Tetrahedron L. 6383 (1966)
59) V.HARIHARAN u. S.RANGASWAMI, Phytochemistry 9, 409 (1970)
60) R.TSCHESCHE u. G.WULF, Tetrahedron 19, 621 (1963)
61) P.J.GAREGG u. B.LINDBERG, Acta chem.scand. 14, 871 (1960)
62) H.KILIANI, Chem.Ber. 63, 2866 (1930)
63) E.L.HIRST, L.HOUGH u. J.K.N.JONES, J.chem.Soc.(London) 928 (1949)
64) C.M.RAFIQUE u. F.SMITH, J.Amer.chem.Soc. 72, 4634 (1950)
65) G.W.HAY, B.A.LEWIS u. F.SMITH, J.Chromatogr. 11, 479 (1963)
66) A.McINNES, D.BALL, F.COOPER u. C.BISHOP, J.Chromatogr. 1, 556 (1960)
67) C.BISHOP u. F.COOPER, Can.J.Chem. 38, 388 (1960)
68) G.O.ASPINALL, J.chem.Soc.(London) 1676 (1963)
69) H.BJÖRNDAL, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Acta chem.scand. 21, 1801 (1967)
70) H.BJÖRNDAL, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Carboh.Res. 5, 43 (1967)
71) H.BJÖRNDAL, C.G.HELLERQUIST, B.LINDBERG u. S.SVENSSON, Angew.Chem. 82, 643 (1970)
72) F.PERCHERON, C.R.hebd.Acad.Sci. 178, 1312 (1924)
73) S.PEAT, W.J.WHELAN u. T.E.EDWARDS, J.chem.Soc.(London) 29 (1961)
74) P.A.J.GORIN u. A.S.PERLIN, Can.J.Chem. 34, 1796 (1961)
75) G.O.ASPINALL, A.J.CHARLSON, E.L.HIRST u. R.YOUNG, J.chem. Soc.(London) 1696 (1963)
76) L.D.OUGH, Analytic.Chem.34, 660 (1962)

77) P.BÄCHLI u. E.G.V.PERCIVAL, J.chem.Soc.(London) 1243 (1952)
78) F.SOSA u. F.PERCHERON, Phytochemistry 9, 441 (1970)
79) S.M.PATRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)
80) C.R.SMITH jr., L.H.NIECE, H.F.ZOBEL u. I.A.WOLFF, Phytochemistry 3, 289 (1964)
81) R.OPFERSCHAUM, Arch.Pharm. 279, 149 (1941)

L e b e n s l a u f

Am 25. September 1940 wurde ich, Peter Kazmaier, als Sohn des Kinderarztes Dr.med. Paul Kazmaier und seiner Ehefrau Erika, geb. Wolf, in Berlin geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1946 bis 1950 in Percha bei Starnberg. Im Anschluß daran besuchte ich sechs Jahre das Humanistische Progymnasium des Klosters Schäftlarn bei München und ab 1957 das Humanistische Gymnasium in München-Pasing, wo ich im Juni 1960 die Reifeprüfung ablegte. Meinen Wehrdienst leistete ich von Oktober 1960 bis Dezember 1961 in Hildesheim ab.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der St.Andreas-Apotheke in München begann ich im Winter-Semester 1963/64 das Studium der Pharmazie an der Ludwigs-Maximilians-Universität München, das ich im November 1966 mit dem Staatsexamen beendete. Von Januar bis November 1967 war ich in der Sendlinger Apotheke Am Harras als Kandidat der Pharmazie tätig.

Seit November 1967 bin ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München beschäftigt. Im Januar 1968 begann ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit vorliegender Arbeit.

Die Bestallung als Apotheker erhielt ich mit Wirkung vom 1. Januar 1968.

Am 9. Juni 1969 heiratete ich meine Frau Jutta Kazmaier, geb. Goetz. Am 13. März 1971 kam unser Sohn Alexander Dominik zur Welt.